

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO MIGUEL JAREK

**FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA NO BRASIL: MÉTODOS DE INOCULAÇÃO,
EFEITO DA COMPACTAÇÃO DO SOLO, PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO
DE ESPÉCIES**

CURITIBA

2018

TIAGO MIGUEL JAREK

**FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA NO BRASIL: MÉTODOS DE INOCULAÇÃO,
EFEITO DA COMPACTAÇÃO DO SOLO, PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO
DE ESPÉCIES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e Produção Vegetal, Área de Concentração Manejo em Fitossanidade e Impacto Ambiental, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Coorientadora: Dr^a Elisa Serra Negra Vieira
Coorientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

J37f Jarek, Tiago Miguel
Fusariose da pupunheira no Brasil: métodos de inoculação, efeito
da compactação do solo, patogenicidade e identificação de espécies /
Tiago Miguel Jarek. - Curitiba, 2018.
94 f.: il., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –
(Produção Vegetal).

Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos

Coorientadora: Elisa Serra Negra Vieira

Coorientador: Dauri José Tessmann

1. Pupunheira – Doenças e pragas. 2. Solos - compactação. 3.
Fungos na agricultura. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Vieira,
Elisa Serra Negra. III. Tessmann, Dauri José. IV. Título. V.
Universidade Federal do Paraná.

CDU 634.613: 631.431.7



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TIAGO MIGUEL JAREK** intitulada: ***FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA NO BRASIL: MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, EFEITO DA COMPACTAÇÃO DO SOLO, PATOGENICIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

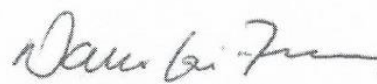
Curitiba, 26 de Fevereiro de 2018.



ALVARO FIGUEREDO DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora



ELISA SERRA NEGRA VIEIRA
Avaliador Externo



DAURI JOSE TESSMANN
Avaliador Externo



LUCIMERIS RUARO
Avaliador Externo



RENATA FAIER CALEGARIO
Avaliador Externo

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos cidadãos, cuja soma dos esforços recolhidos na forma de impostos foi redirecionada através do Estado para viabilizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte maior de todo aprendizado.

A minha mãe Joana Perantoni Jarek, professora das principais lições que aprendi, e toda minha família por sempre estarem ao meu lado, nas conquistas e dificuldades.

A minha noiva “Sah” que esteve sempre comigo, minha motivação, e minha confidente. E voluntária no laboratório nas determinações de peso seco.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia e Produção Vegetal pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos pela confiança depositada e seus ensinamentos de ciência, ética, valores e trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Dauri José Tessmann pelos ensinamentos no processo de qualificação, o compartilhamento do conhecimento sobre *Fusarium* e pela oportunidade de participar do Tropical *Fusarium* Workshop 2016.

A coorientadora Dr^a Elisa Serra Negra Vieira pelos ensinamentos e paciência na execução das análises moleculares, em especial por possibilitar o uso do Laboratório de Sementes Florestais.

À Prof^a Dr^a Lucimeris pela amizade, parceria e por possibilitar realizar a prática a docência II na disciplina Fitopatologia Especial.

À Prof^a Dr^a Louise Larissa May de Mio por possibilitar realizar a prática a docência na disciplina Fitopatologia Geral.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Caroline e Davi, por todo o apoio prestado em vários momentos, e pelo agradável convívio nesse período.

Aos Laboratórios da Embrapa: Patologia Florestal, Biologia Molecular, Propagação de Espécies Florestais, Sementes Florestais, Física e Química dos Solos e o Setor de Manutenção e Veículos.

Aos Laboratórios da Universidade Federal do Paraná: Fitotecnia, Ecofisiologia e Patologia de Sementes.

Aos técnicos da Embrapa Adilson, Ozias, Dayane, Mariane pelo apoio prestado.

Aos técnicos de laboratório da Universidade Federal do Paraná: Virgínia, Maria Emília, Cléia Maria, e Roger.

À Lucimara, secretária do Programa de Pós Graduação, pela presteza e eficiência na solução de dúvidas, e seu exemplo de dedicação e superação.

Aos amigos e colegas Edson, Flávia e Ana Lúcia pela parceria e amizade, nas viagens de congressos, no trabalho, e vários momentos compartilhados.

As colegas Géssica, Heloíse, Cecília e Eduardo pelo companheirismo durante essa jornada.

Aos estagiários que contribuíram na execução dos trabalhos: Rodrigo, Heliethi, João, Milena, Nicolas, Nivaldo.

Ao Viveiro de mudas M&M pela contribuição e disponibilidade de mudas para realização dos experimentos.

À CAPES pela bolsa de estudos, sem a qual eu não poderia realizar esse sonho.

. Enfim, muito obrigado a todos os envolvidos nessa caminhada que direta ou indiretamente, puderam tornar esse projeto possível.

RESUMO

Nos últimos anos, nos plantios brasileiros de pupunheira, vem ocorrendo uma doença conhecida como fusariose que pode tornar-se um fator limitante à cultura. Por ser uma doença de ocorrência recente, existem poucas informações a respeito de sua etiologia e seu manejo. Os objetivos deste trabalho foram: Identificar as espécies de *Fusarium* associadas á fusariose e endofíticas, desenvolver métodos de inoculação do patógeno e avaliar o efeito da compactação do solo na incidência e severidade da doença. A tese é apresentada em quatro capítulos, conforme segue:

Capítulo 1 – Métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium* spp. em pupunheira. O Capítulo 1 trata de métodos de inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira. Para testar os métodos de inoculação foi utilizada apenas a espécie *Fusarium proliferatum*, por ser a mais representativa neste hospedeiro. Os demais isolados envolvendo complexo de espécies *F. oxysporum* (FOCS), complexo de espécies *F. solani* (FSCS), complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (GFCS) e *F. verticillioides* apresentaram sintomas da doença quando inoculados em pupunheira. Foi testada a inoculação em folhas, caule e raízes utilizando seringa e suspensão de conídios. Em raízes além da inoculação com seringa, também foi testado outros três métodos para raízes, sendo eles: imersão de raízes em suspensão de conídios; rega de conídios em plantas sem transplante, e incorporação de milho triturado colonizado com *Fusarium*. O método de inoculação de raízes com milho triturado colonizado com *F. proliferatum* foi o mais adequado para trabalhos com a fusariose.

Capítulo 2 - Compactação de solo como um fator de predisposição à fusariose da pupunheira. A compactação do solo pode estar associada a ocorrência da fusariose em diversos hospedeiros, como feijão, soja e ervilha. Em outros patógenos também já foi verificada essa relação, como é o caso de meloidoginose e hérnia das crucíferas. Para testar o efeito da compactação do solo sobre a fusariose da pupunheira, foi utilizado como substrato um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, o qual apresentava densidade de $0,9 \text{ Kg.dm}^{-3}$. Foram testados três níveis de compactação correspondentes as seguintes densidades 0,9; 1,1; e $1,3 \text{ Kg.dm}^{-3}$. A compactação foi realizada por meio de prensa hidráulica em vasos cilíndricos feitos a partir de tubos de PVC com diâmetro de 150 mm. Os tratamentos foram conferidos por meio de um penetrômetro e pela densidade medida com anéis volumétricos. A compactação do solo, isoladamente, reduziu o crescimento de raízes, caule e folhas.

A compactação com o efeito adicional da fusariose aumentou a severidade da doença e reduziu do crescimento da planta. Capítulo 3 - Patogenicidade de *Fusarium proliferatum*, Complexo de espécies *F. chlamydosporum* (FCSC) e Complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), endofíticos à pupunheira. Algumas pesquisas têm demonstrado nos últimos anos a associação de fungos fitopatogênicos, presentes na forma endofítica em diversos hospedeiros. Em pupunheira foram encontradas três espécies de *Fusarium*, e a patogenicidade foi confirmada cumprindo-se os postulados de Koch. As espécies endofíticas encontradas foram *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum* e *F. chlamydosporum* e apenas FOSC não foi patogênica à pupunheira. Capítulo 4 - Identificação das espécies de *Fusarium* causadoras da fusariose da pupunheira no Brasil. Pelo menos cinco espécies de *Fusarium* já foram relatadas em pupunheira no Brasil, sendo elas: Complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC), *F. anthophilum*, Complexo de espécies *F. solani* (FSSC), *F. subglutinans*, *F. moniliforme*. Como principal resultado deste capítulo, foram identificadas as seguintes espécies de *Fusarium*: *F. proliferatum*; FOSC; FSSC; *F. verticillioides*; FFSC e FCSC. *Fusarium proliferatum* é a espécie predominante nos plantios brasileiros da pupunheira, ocorrendo como endofítico e associado à Fusariose.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes*. Compactação de solo. Endofíticos.

ABSTRACT

In the last years, in the Brazilian plantations of peach palm, a disease known as fusariosis has been occurring, which can become a limiting factor to the culture. Because it is a disease of recent occurrence, there is little information about its etiology and its management. The objectives of this work were: to identify the *Fusarium* species endophytic and associated with fusariosis, to develop pathogen inoculation methods and to evaluate the effect of soil compaction on the incidence and severity of the disease. The thesis is presented in four chapters, as follows: Chapter 1 - Methods of inoculation and aggressiveness of *Fusarium* spp. in peach palm. Chapter 1 deals with inoculation methods for *Fusarium* spp. in peach palm. To test the inoculation methods, only the *Fusarium proliferatum* species was used, because it is the most representative in this host. The other isolates involving *F. oxysporum* species complex (FOCS), of *F. solani* species complex (FSCS), *Fusarium fujikuroi* species complex. (FFCS) and *F. verticillioides* presented symptoms of the disease when inoculated with peach palm. Leaf, stem and root inoculation was tested using syringe and conidial suspension. In roots other than syringe inoculation, three root methods were also tested: roots immersion in conidia suspension, conidia irrigation in plants without transplant, and incorporation of ground corn colonized with *Fusarium*. The method of inoculation of roots with ground corn colonized with *F. proliferatum* was the most suitable for work with fusariosis. Chapter 2 - Compaction of soil as a predisposing factor to the fusariosis of peach palm. Soil compaction may be associated with the occurrence of fusariosis in several hosts, such as beans, soybeans and peas. In other pathogens, this relationship has already been verified, such as meloidoginosis and clubroot. In order to test the effect of soil compaction on the fusariosis of peach palm, a dystrophic Yellow Red Latosol was used as soil substrate, which had a density of 0.9 Kg.dm^{-3} . Three compaction levels were tested corresponding to the following soil densities of 0.9; 1.1; and 1.3 Kg.dm^{-3} . The soil was compacted by hydraulic press in cylindrical vessels made from PVC pipes with a diameter of 150 mm. The treatments were checked through a penetrometer and the density measured with volumetric rings. Soil compaction, in *Fusarium* ausent, reduced root, stem and leaf growth. Compaction with the additional effect of fusariosis increased the severity of the disease and reduced plant growth. Chapter 3 - Pathogenicity of *Fusarium proliferatum*, *F. chlamydosporum* species complex

(FCSC) and *F. oxysporum* species complex (FOSC), endophytic to peach palm. Some researches have demonstrated in the last years the association of phytopathogenic fungi, present in the endophytic form in several hosts. Three species of *Fusarium* were found in peach palm, and only FOSC wasn't pathogenic confirmed by fulfilling Koch's postulates. The endophytic species found were *Fusarium proliferatum*, FCSC, *F. proliferatum* and FOSC. Aren't pathogenic to peach palm only FOSC. Chapter 4 - Identification of *Fusarium* species causing fusariosis of peach palm in Brazil. At least five species of *Fusarium* have been reported in peach palm in Brazil, being *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), *F. anthophilum*, *F. solani* species complex (FSSC), *F. subglutinans*, *F. moniliforme*. As the main result of this chapter, the following *Fusarium* species were identified: *F. proliferatum*; FOSC; FSSC; *F. verticillioides*; FFSC; FCSC. *Fusarium proliferatum* is the predominant species in the Brazilian plantations of peach palm occurring as endophytic and associated with *Fusarium*.

Key-words: *Bactris gasipaes*. Compaction of soil. Endophytes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. PLANTAS DE PUPUNHEIRA COM RAÍZES INOCULADAS COM *F. proliferatum*, E MANTIDAS EM TUBOS DE ENSAIO CONTENDO ÁGUA ULTRAPURA.

FIGURA 1.2. A) TRATAMENTO TESTEMUNHA -FOLHA DE PUPUNHEIRA INOCULADA COM ÁGUA B) SINTOMAS EM FOLHA INOCULADA COM *Fusarium proliferatum* AOS 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (DAÍ); C) SINTOMAS NA FOLHA AOS 15 DAÍ; D) TRATAMENTO TESTEMUNHA - RAIZ NÃO INOCULADA EM CORTE LONGITUDINAL (AUMENTO 7,5X); E) CONTROLE COM RAIZ INOCULADA COM ÁGUA (AUMENTO 7,5X); F) SINTOMAS EM RAIZ INOCULADA COM *F. proliferatum* (AUMENTO 7,5X); G) CONTROLE COM CAULE NÃO INOCULADO VISTA EM CORTE; H) CONTROLE COM CAULE INOCULADO COM ÁGUA; I) CAULE INOCULADO COM *Fusarium proliferatum*; J) RAÍZES DA TESTEMUNHA PARA O ENSAIO CONDUZIDO EM SUBSTRATO; K) RAÍZES DO TRATAMENTO COM MILHO TRITURADO SEM FUNGO (CONTROLE); L) RAÍZES DAS PLANTAS INOCULADAS COM *F. proliferatum* USANDO MILHO TRITURADO.

FIGURA 1.3 – BILOT DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP) PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS RESPOSTA ALTURA (H), PESO TOTAL (PT), PESO DE RAÍZES (PR) E SEVERIDADE (S) PARA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO COM OS TRATAMENTOS SP-5 E SP-3 (ISOLADOS) E TESTEMUNHA (TEST) PARA OS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO: A) INJEÇÃO, B) IMERSÃO, C) FERIMENTO, D) QUIRERA.

FIGURA 2.1 – PROCEDIMENTO PARA COMPACTAÇÃO DO SOLO UTILIZANDO PRENSA HIDRÁULICA E VASOS FEITOS DE TUBOS DE PVC, ATÉ IMPRIMIR O VOLUME CORRESPONDENTE À DENSIDADE DE COMPACTAÇÃO.

FIGURA 2.2 – RESISTÊNCIA A PENETRAÇÃO MEDIDA COM PENETRÔMETRO, EM TRÊS NÍVEIS DE DENSIDADE DE COMPACTAÇÃO DO SOLO (0,9; 1,1 E 1,3 KG DM³) EM PROFUNDIDADE DE 10 A 30 CM.

FIGURA 2.3 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA EM QUATRO DOSES DE INÓCULO (40, 80, 120 E 160 G DE MILHO TRITURADO COLONIZADO COM *Fusarium proliferarum* POR dm^{-3} DE SOLO), POR UM PERÍODO DE 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO. SEVERIDADE VARIANDO DE 0 (AUSÊNCIA DE SINTOMAS) A 4 (PLANTA MORTA), SENDO 0 A PLANTA SEM SINTOMAS, 1 PLANTA COM LEVE AMARELECIMENTO NAS EXTREMIDADES DAS FOLHAS, 2 PLANTA APRESENTANDO EM TORNO DE 2 FOLHAS NECROSADAS, 3 PLANTA APRESENTANDO APENAS UMA FOLHA VERDE, E 4 A PLANTA MORTA.

FIGURA 2.4 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE EM TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DE SOLO (DENSIDADE (D) 0,9, 1,1, E 1,3 KG DM^{-3}) AO LONGO DE 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO. SEVERIDADE VARIANDO DE 0 (AUSÊNCIA DE SINTOMAS) A 4 (PLANTA MORTA), SENDO 0 A PLANTA SEM SINTOMAS, 1 PLANTA COM LEVE AMARELECIMENTO NAS EXTREMIDADES DAS FOLHAS, 2 PLANTA APRESENTANDO EM TORNO DE 2 FOLHAS NECROSADAS, 3 PLANTA APRESENTANDO APENAS UMA FOLHA VERDE, E 4 A PLANTA MORTA.

FIGURA 2.5 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS ALTURA, PESO SECO DE RAIZES, PESO SECO TOTAL, SEVERIDADE E COMPACTAÇÃO DO SOLO EM MUDAS EM PUPUNHEIRA INOCULADAS COM *Fusarium proliferatum*. PC1 – COMPONENTE PRINCIPAL 1; PC2 – COMPONENTE PRINCIPAL 2

FIGURA 2.6 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA EM TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO: DA ESQUERDA PARA A DIREITA 0,9; 1,1 E 1,3 KG.DM^{-3} RESULTANDO NA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO PROVOCADO PELA COMPACTAÇÃO EM SOLO INFESTADO COM *Fusarium proliferatum*.

FIGURA 2.7 – EFEITO DA COMPACTAÇÃO DO SOLO SOBRE O CRESCIMENTO DE RAÍZES DE PUPUNHEIRA NA PRESENÇA DE *Fusarium proliferatum*. A) SEM COMPACTAÇÃO; B) DENSIDADE DE 1,1; C) DENSIDADE DE 1,3 Kg.dm^{-3} .

FIGURA 3.1 – MICROPIPETAGEM EM PPD (PLACAS DE POLIESTIRENO DESCARTÁVEIS) (A); MICROGOTAS DE SOLUÇÃO COM ESPOROS MANTIDAS ISOLADAS EM PPD (B).

FIGURA 3.2 – REGIÃO ENCHARCADA ONDE OCORREU A INJEÇÃO DE SUSPENSÃO DE CONÍDIOS NO MESÓFILO DE FOLHAS DE PUPUNHEIRA PARA TESTE DE PATOGENICIDADE.

FIGURA 3.3 – SINTOMAS DE *Fusarium proliferatum* EM FOLHAS DE PUPUNHEIRA. A) SETE DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, B) 14 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, C) 21 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, D) 28 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.

FIGURA 4.1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA UTILIZANDO O MÉTODO NEIGHBOR-JOINING, COM NÚMERO DE REPLICAÇÕES DO BOOTSTRAP DE 500, MODELO DE MAXIMUM COMPOSITE LIKELIHOOD E O MODO DE TRATAMENTO DOS GAPS DE COMPLETA DELEÇÃO.

FIGURA 4.2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Fusarium* (*F. proliferatum*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium fujikuroi* (FFSC), COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. chlamydosporum*) NAS REGIÕES PRODUTORAS DE PUPUNHEIRA NO BRASIL.

FIGURA 4.3 – CHAVE PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Fusarium* DA PUPUNHEIRA NO BRASIL.

FIGURA 4.4 – MARCADORES MORFOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE FUSARIUM EM PUPUNHEIRA. A) POLIFIÁLIDES; B) MONOFIÁLIDES; C) CADEIAS DE MICROCONÍDIOS; D) FALSAS CABEÇAS; E) CLAMIDÓSPOROS.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – AGRESSIVIDADE DE 31 ISOLADOS DE *Fusarium proliferatum*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. solani* E COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium fujikuroi* À PUPUNHEIRA, UTILIZANDO-SE INOCULAÇÃO COM FERIMENTO NO CAULE E CONDUÇÃO DAS MUDAS EM TUBOS DE ENSAIO COM ÁGUA.

TABELA 2.1. ANÁLISE QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DA CAMADA 0-20 CM DE UM LATOSSOLO VERMELHO AMARELO DISTRÓFICO (LVad) UTILIZADO PARA O PLANTIO DAS MUDAS

TABELA 2.2 – NÍVEIS DE UMIDADE DO SOLO ANTES DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO DE COMPACTAÇÃO DETERMINADOS PELO PESO ÚMIDO (PU) EM RELAÇÃO AO PESO SECO (PS) ATÉ PESO CONSTANTE EM ESTUFA (60° C).

TABELA 2.3 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE DO SOLO (D) DETERMINADA PELO MÉTODO DOS ANÉIS VOLUMÉTRICOS (AV) E A DENSIDADE DE SOLO ESTIMADA PARA OS TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO COM QUATRO REPETIÇÕES.

TABELA 2.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS MUDAS DE PUPUNHEIRA NO MOMENTO DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO, PARA AS VARIÁVEIS PESO TOTAL SECO (PTS), PESO SECO DE RAÍZES (PSR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), DIÂMETRO DO CAULE À ALTURA DE 1,5 cm (DC), ALTURA (H) E PESO FRESCO (PF).

TABELA 2.5 – CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE PUPUNHEIRA EM QUATRO DOSES DE MILHO TRITURADO (40, 80, 120, 160 g.dm⁻³) COM E SEM *Fusarium proliferatum*.

TABELA 2.6 – ALTURA, PESO SECO DE RAÍZES E PESO SECO DE PARTE AÉREA (CAULE E FOLHAS) DE PLANTAS DE PUPUNHEIRA, AOS 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DE *Fusarium proliferatum* SOB TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO.

TABELA 2.7 – CARGAS FATORIAIS, AUTO-VALORES E VARIÂNCIA EXPLICADA DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS ALTURA, PESO DE RAIZES, PESO DE CAULE E FOLHAS, E SEVERIDADE DA FUSARIOSE.

TABELA 3.1 – PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ENDOFÍTICOS À PUPUNHEIRA.

TABELA 3.2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

TABELA 3.3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

TABELA 4.1 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

TABELA 4.2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO FATOR DE ELONGAÇÃO 1-A PARA ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS Á FUSARIOSE.

.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1 – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE <i>Fusarium</i> À PUPUNHEIRA	24
1.1 INTRODUÇÃO	26
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
1.2.1 Origem dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	27
1.2.2 Preparo do inóculo.	27
1.2.3 Experimento 1- Inoculação de <i>F. proliferatum</i> em folhas, caule e raízes.	28
1.2.4 Experimento 2 - Avaliação de agressividade de 31 isolados de <i>Fusarium</i> em caule... ..	29
1.2.5 Experimento 3- Comparação de métodos de inoculação de <i>Fusarium</i> em raízes.....	30
1.2.6 Condições de condução e avaliação	31
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.4 CONCLUSÕES	39
1.5 REFERENCIAS	39
CAPÍTULO 2 – COMPACTAÇÃO DO SOLO COMO FATOR DE PREDISPOSIÇÃO À FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA	41
2.1 INTRODUÇÃO	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
2.4 CONCLUSÕES	55
2.5 REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE DE <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> E <i>F. oxysporum</i> , ENDOFÍTICOS À PUPUNHEIRA.....	58
3.1 INTRODUÇÃO	59
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.2.1 Origem dos isolados e isolamento	60
3.2.2 Identificação de <i>Fusarium</i>	61
3.2.2.1Obtenção de culturas monospóricas.....	61
3.2.2.2Caracterização morfológica.....	62
3.2.2.3Caracterização molecular.....	63
3.2.3 Teste de patogenicidade	63
3.2.4 Reisolamento do patógeno	64
3.2.5 Análise dos dados e condições de condução e avaliação dos experimentos	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.4 CONCLUSÕES	71
3.5 REFERÊNCIAS.....	72

	CAPÍTULO 4 – IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> CAUSADORAS DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA NO BRASIL.....	74
4.1	INTRODUÇÃO	75
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	77
4.2.1	Origem dos isolados:	77
4.2.2	Identificação das espécies de <i>Fusarium</i>	77
4.2.2.1	Caracterização morfológica.....	77
4.2.3	Caracterização molecular.	78
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.4	CONCLUSÕES.....	89
4.5	REFERÊNCIAS.....	88
5	REFERÊNCIAS.....	90

INTRODUÇÃO GERAL

Os maiores exportadores mundiais de palmito são Costa Rica e Equador. O Brasil, embora seja um grande produtor mundial, é também um grande consumidor, destinando assim a maior parte de sua produção para o mercado interno (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014).

A cultura da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) vem se expandindo nos últimos anos, em vários estados brasileiros sendo que, Bahia, Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina se destacam como os maiores produtores com uma área total que corresponde a cerca de 20.000 hectares (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). Apenas no estado do Paraná houve uma evolução da área plantada de 308 hectares em 2008 (SANTOS et al., 2008) para cerca de 1650 ha em 2017 e de 64 produtores, em 2000, para 650 produtores em 2017 (EMBRAPA, 2017). Esse crescimento se deve principalmente à substituição de um sistema extrativista do palmito de juçara (*Euterpe edulis*) para um palmito cultivado (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). A pupunheira apresenta a vantagem de possibilitar cortes sucessivos, ou seja, uma mesma planta pode ser manejada para corte de hastes por períodos que chegam até 20 anos. Além disso, a oxidação do palmito após o corte ocorre mais lentamente, possibilitando a comercialização do palmito *in natura* (SANTOS et al., 2008; PENTEADO JÚNIOR et al., 2014).

No âmbito internacional existe uma referência na Costa Rica, à uma doença chamada “Bacteriosis del palmito” a qual teria como agentes etiológicos *Pantoea stewartii* e *Fusarium* sp. (ARROIO-OQUENDO et al., 2007), embora esse relato não seja propriamente da Fusariose da pupunheira mas sim de uma doença que tem *Fusarium* sp. associado.

No âmbito nacional a fusariose da pupunheira tem sido encontrada em diferentes regiões do país, e várias espécies têm sido identificadas. Os sintomas observados nos plantios são de amarelecimento de folhas progredindo até a morte da planta.

A fusariose foi descrita pela primeira vez, no Brasil, em 1998 por Pizzinato (PIZZINATO et al., 1998) no estado de São Paulo. Pizzinato et al (2001), relataram a associação de cinco espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme*) à doença. ALVES & SANTOS (2006) demonstraram

a patogenicidade de 15 isolados de *Fusarium* spp. e observaram variações na agressividade dos mesmos, porém todos causavam sintomas.

De acordo com Costa Júnior et al. (2016) a fusariose observada nos plantios de pupunheira pode se tornar a principal doença da cultura. Recentemente, os mesmos autores relataram a transmissão deste patógeno por sementes de pupunheira. Em 2014, Souza estudando a caracterização de isolados de *Fusarium* spp. associados á Podridão da base do estipe da pupunheira, verificou que *Fusarium proliferatum* é a espécie mais frequentemente associada. São relatadas também as espécies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme* (SOUZA, 2014; PIZZINATO et al., 2001). No entanto, por ser uma doença de ocorrência recente, ainda são poucas as informações a respeito da sua etiologia.

O método de inoculação é uma das dificuldades em se trabalhar com a fusariose da pupunheira, conforme relatos de COSTA et al. (2012) e KLINGELFUSS et al. (2007), pois trabalhos anteriores feitos por PIZZINATO et al. (2001) e COSTA JÚNIOR (2013) encontraram na reprodução dos sintomas e elevado percentual de plantas injuriadas no tratamento testemunha, ao inocular com métodos de injeção no caule e ferimentos de raízes. No teste de inoculação nem sempre os sintomas observados são idênticos aos que ocorrem nos plantios, sendo que, em alguns casos são necessárias até oito semanas para o aparecimento de sintomas típicos (ALVES et al., 2006, PIZZINATTO et al., 2001). A inoculação pode causar injúrias no estipe às plantas chegando a provocar a morte das mesmas (COSTA JÚNIOR, 2013). Além disso, os resultados não são reproduzidos quando os experimentos são repetidos utilizando o mesmo isolado de *Fusarium* (PIZZINATO et al., 2001; COSTA JÚNIOR, 2013).

Um dos fatores edáficos limitante para o desenvolvimento de diversas culturas é a compactação do solo (SILVA & ROSOLEM, 2002). A ocorrência da fusariose e sua relação com as características físicas do solo em alguns patossistemas já foi verificada em plantas de feijoeiro (CICHY et al., 2007), ervilha (KRAFT & BOGE, 2001) e soja (CHONG et al., 2004). Outras doenças radiculares também já apresentaram o mesmo comportamento como a hérnia das crucíferas (GOSSEN et al., 2016) e melodoiginose (GANJI et al., 2013). Estudos desta natureza para o patossistema *Fusarium* X pupunheira ainda são inexistentes.

Em alguns hospedeiros tem-se verificado a presença de *Fusarium* spp. como endofítico. *F. verticillioides*, causador da podridão da espiga do milho, é comumente encontrado como endofítico, e o número de plantas assintomáticas está relacionada com o genótipo do hospedeiro (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Em pupunheira, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *Fusarium* sp. já foram encontrados endofiticamente em ápices caulinares *in vitro*. Estes fungos tiveram a patogenicidade comprovada em condições de micropropagação (ALMEIDA et al., 2005).

Diante da falta de informações sobre o patossistema *Fusarium* X pupunheira, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar espécies de *Fusarium* patogênicas à pupunheira.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Avaliar métodos de inoculação de *Fusarium* spp. na pupunheira;
- b) Avaliar o efeito da compactação do solo sobre a incidência e a severidade da fusariose da pupunheira;
- c) Isolar, identificar, caracterizar e avaliar a patogenicidade de isolados endofíticos de *Fusarium* spp. à pupunheira;
- d) Caracterizar, por análises molecular e morfológica, e identificar as espécies de *Fusarium* causadoras da fusariose da pupunheira no Brasil.

A tese está organizada em quatro capítulos, conforme segue:

Capítulo 1 – Métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium* à pupunheira.

Capítulo 2 – Compactação de solo como um fator de predisposição à fusariose da pupunheira.

Capítulo 3 – Patogenicidade de *Fusarium proliferatum*, *F. chlamydosporum* e *F. oxysporum*, endofíticos à pupunheira

Capítulo 4 – Identificação das espécies de *Fusarium* causadoras da fusariose da pupunheira no Brasil

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.V. de et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40, n.5, p.467-470, 2005.
- ALVES, S.A.R. et al. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a Podridão do Estipe da Pupunheira no Paraná. **Boletim Pesquisa Florestal**, v.52, p.133-140, 2006.
- ARROIO-OQUENDO, C.; BOGANTES-ARIAS, A.; MORA-URPÍ, J. La deshoja en el manejo de la “Bacteriosis” del palmito de Pejibaye (*Bactris gasipaes*). **Agronomia Mesoamericana**, v. 18, n.1, p.129-138, 2007.
- CHONG, S.K et al. Mapping soybean sudden death syndrome as related to yield and soil/site properties. **Soil & Tillage Research**, v.84, p.101-107. 2005.
- CICHY, K.A; SNAPP, S,S; KIRK, W.W. *Fusarium* root rot incidence and root system architecture in grafted commom bean lines. **Plant Soil**, v.300, p.233-244. 2007.
- COSTA JÚNIOR, J.C. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pupunheira submetidas a tratamento químico e caracterização dos sintomas da podridão da base do estipe causada por *Fusarium* spp.** 2013. Curitiba: UFPR. 127p (Dissertação Mestrado).
- COSTA JÚNIOR, J.C. da et al. Qualidade Sanitária e Fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. E tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1119-1131. 2016.
- COSTA, R.V. et al. Metodologia para avaliação da reação de genótipos de milho à *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação. **Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo**, v.179, p.1-7, 2012.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo de pupunha redesenha a agricultura no litoral do Paraná. Notícias, 14 de março de 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20828921/cultivo-de-pupunha-redesenha-a-agricultura-do-litoral-do-parana>> acesso em: 19 nov. 2017.
- GANJI, S; WUBBEN, M.J; JENKINS, J.N. Two simple methods for the collection of individual life stages of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology**, v.45, n.2, p.87-91. 2013.
- GOSEN, B.D et al. Effect of soil type, organic matter content, bulk density and saturation on clubroot severity and biofungicide efficacy. **Plant Pathology**, v.65, p. 1238-1245. 2016.
- KLINGELFUSS, L.H. et al. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira** v.32, n.1, p.50-55, 2007.
- KRAFT, J.M; BOGE, W. Root characteristics in Pea in Relation to compaction and *Fusarium* Root Rot. **Plant Disease**, vol. 85, n.9, p.936-940. 2001.

LESLIE, J; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. USA: Iowa, 2006. 420 p.

MEDEIROS, R.D. de; SOARES, A.A; GUIMARÃES, R.M. Efeitos da compactação do solo e do manejo da água sobre os componentes de produção e a produtividade de grãos de arroz. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, n.5, p.960-967. 2005.

PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.

PIZZINATO, M.A et al. Patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* á plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, suplement., p 272, 1998.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

RODRIGUES, P.N.F et al. Crescimento e composição mineral do milho em função da compactação do solo e da aplicação de composto orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.1, p.94-99, 2008.

SANTOS, A.F. dos et al. Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2008.

SILVA, R.H. da; ROSOLEM, C.A. Crescimento radicular da soja em razão da sucessão de cultivos e da compactação do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.855-860, 2002.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

SOUZA, M.A.S et al. Acúmulo de macronutrientes na soja influenciado pelo cultivo prévio do capim-marandu, correção e compactação do solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.611-622. 2012.

CAPÍTULO 1 – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE *Fusarium* À PUPUNHEIRA¹

RESUMO

A fusariose é uma das principais doenças da pupunheira, ocorrendo em diferentes regiões do Brasil, podendo ser um fator limitante a expansão dos cultivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos de inoculação e a agressividade de isolados de *Fusarium* à pupunheira. Para testar os métodos de inoculação foi utilizado um isolado de *Fusarium proliferatum*, pois esta é a espécie mais representativa desta doença. Foi testada ainda a agressividade de 31 isolados de 2 espécies e três complexos de espécies. Inicialmente foram inoculadas folhas, caule e raízes de pupunheira em diferentes plantas. Para as raízes foram testados quatro diferentes métodos de inoculação sendo eles: injeção de suspensão de conídios, imersão das raízes cortadas em suspensão de conídios, fermento das raízes e rega de suspensão de conídios, e incorporação de milho triturado colonizado por *F. proliferatum* ao substrato de mudas transplantadas. Demonstrou-se que *Fusarium proliferatum* pode infectar folhas, caule e raízes de pupunheira. Verificou-se que as espécies *F. proliferatum*, complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides*, complexo de espécies *F. solani* (FSSC) e complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) são patogênicas à pupunheira, desenvolvendo sintomas externamente, e internamente na região do ápice caulinar. O uso de milho triturado colonizado por *Fusarium* para inoculação de raízes foi efetivo e reduziu o nível de injúrias às plantas.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes* var. *gasipaes*. Palmito pupunha. Fusariose.

¹ Artigo aceito na Revista Ciência Rural em 20 de outubro de 2017 (No prelo)

CHAPTER 1 – INOCULATION METHODS AND *Fusarium* AGGRESSIVENESS OF FIVE SPECIES IN PEACH PALM

ABSTRACT

The fusariosis is one of the main diseases of the pupunheira, occurring in different regions of Brazil, being able to be a limiting factor to the expansion of the cultures. The objective of this work was to evaluate inoculation methods and the aggressiveness of *Fusarium* isolates to peach palm. To test the inoculation methods a *Fusarium proliferatum* isolate was used, as this is the most representative species of this disease. The aggressiveness of 31 isolates from 2 species and 3 species complexes was also tested. Initially leaves, stem and roots of peach palm were inoculated in different plants. For the roots, four different methods of inoculation were tested: conidial suspension injection, immersion of the conidial suspension roots, root injury and conidia suspension irrigation, and incorporation of ground corn colonized by *F. proliferatum* to the substrate of transplanted seedlings. It has been shown that *Fusarium proliferatum* can infect leaves, stem and roots of peach palm. It was verified that *F. proliferatum* species, *F. oxysporum* complex (FOSC), *F. verticillioides*, *F. solani* species complex (FSSC) and *Fusarium fujikuroi* complex (FFSC) are pathogenic to peach palm, developing symptoms externally, and internally in the region of the caulinar apex. The use of ground corn colonized by *Fusarium* for root inoculation was effective and reduced the level of injuries to plants.

Key-words: *Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson, Hearts peach palm, *Fusarium* wilt.

1.1 INTRODUÇÃO

A expansão dos plantios de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) para produção de palmito vem crescendo nos últimos anos em vários estados brasileiros, tais como Bahia, Goiás, São Paulo, Mato Grosso e Santa Catarina (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). Sua importância se deve principalmente à substituição do palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius), explorado de forma extrativista na Mata Atlântica, por um palmito cultivado que permite cortes sucessivos por vários anos e apresenta características diferenciadas, tais como o perfilhamento, ciclo precoce, e a não oxidação do palmito após o corte, que permite a sua comercialização *in natura* (SANTOS et al., 2008).

A Fusariose, causada pelo fungo *Fusarium* spp., é uma das principais doenças da pupunheira. A Fusariose causa o amarelecimento da folha bandeira, seguido do amarelecimento das demais folhas progredindo até a morte da planta-mãe e, às vezes, da touceira, com redução do estande em viveiros e plantios adultos (PIZZINATTO et al., 2001). *Fusarium* pode ser disseminado pelas sementes e encontra-se nas principais regiões produtoras brasileiras (SANTOS et al., 2008; COSTA JÚNIOR et al., 2016). De acordo com COSTA JÚNIOR et al. (2016) a doença pode ser um fator limitante à expansão dos plantios de pupunheira.

Várias espécies de *Fusarium* têm sido associadas com a Fusariose da pupunheira sendo descritas basicamente por dois autores, Pizzinatto et al., 2001 (*F. anthophilum*, *F. oxysporum*, *F. solani*; *F. subglutinans* e *F. moniliforme*) e Souza, 2014 (*F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, e *F. oxysporum*). Recentemente espécies como *F. oxysporum*, *F. solani* e *Fusarium fujikuroi* receberam o título de complexo de espécies, devido as divergências filogenéticas dentro do mesmo grupo. Desta forma as espécies anteriormente citadas passaram a ser chamadas complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), complexo de espécies *F. solani* (FSSC), e complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). No entanto, há falta de informações sobre a agressividade destas espécies à pupunheira e métodos adequados de inoculação do patógeno.

Uma das dificuldades em se trabalhar com patossistemas envolvendo *Fusarium* está relacionada com os métodos de inoculação por tratar-se de um fungo de solo (COSTA et al., 2012; KLINGELFUSS et al., 2007). Em trabalhos

relacionados à fusariose da pupunheira têm-se encontrado dificuldades na reprodução dos sintomas (PIZZINATO et al., 2001; COSTA JÚNIOR, 2013). Os sintomas observados no campo não são reproduzidos em testes de inoculação, demorando até oito semanas para o aparecimento de sintomas típicos (ALVES et al., 2006, PIZZINATTO et al., 2001). É relatado também elevado nível de injúrias nas plantas inoculadas, chegando a causar morte das plantas por ferimentos provocados durante a inoculação (COSTA JÚNIOR, 2013). Além disso, alguns trabalhos apresentam resultados não reprodutíveis em experimentos sucessivos utilizando o mesmo isolado de *Fusarium* (PIZZINATO et al., 2001; COSTA JÚNIOR, 2013). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar métodos de inoculação e a agressividade de isolados de *Fusarium* à pupunheira.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Origem dos isolados de *Fusarium* spp.

Foram utilizados 31 isolados de *Fusarium* spp. de cinco estados brasileiros da coleção de Fungos Florestais do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo-PR, conforme segue: *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), complexo de espécies *F. solani* (FSSC), complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) e *Fusarium* sp. Os isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos de plantas de pupunheira com sintomas de fusariose de plantios localizados nos estados de São Paulo, Rondônia, Paraná, Santa Catarina (Tabela 1).

1.2.2 Preparo do inóculo.

Foram utilizados dois tipos de inóculo, o primeiro foi feito com suspensão de macro e microconídios, e o segundo com o crescimento e colonização do fungo sobre milho triturado.

Para a produção da suspensão de macro e microconídios os isolados de *Fusarium* spp. foram cultivados em placas de petri contendo meio de batata-dextrose-água (BDA), por 15 dias, no escuro, a 24°C. Foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada por placa de Petri e, em seguida, a suspensão de

macroconídios e microconídios foi calibrada, com auxílio de uma câmara de Newbauer, para 1×10^6 conídios.mL⁻¹.

No preparo do milho triturado (peneira de 1,6 mm) para cultivo de *F. proliferatum*, autoclavou-se o material por 30 minutos (121°C, 1 atm). Após, adicionou-se cinco discos (diâmetro de 4 mm) de meio de BDA com micélio de *Fusarium* para frascos contendo milho triturado com 20% de água (200 g de milho triturado e 40 mL de água), conforme COSTA et al. (2012). Este material foi incubado no escuro á 24° C por 15 dias.

1.2.3 Experimento 1- Inoculação de *F. proliferatum* em folhas, caule e raízes.

As mudas de pupunheira, com quatro meses de idade e altura média de 10 cm, obtidas de viveiro comercial foram inoculadas isoladamente para cada uma das partes, utilizando-se 30 mudas sendo 10 para folhas, 10 para caule e 10 para raízes. Foram utilizadas 10 repetições sendo cada repetição uma muda, e dois tratamentos para cada região da planta inoculada: inoculada com patógeno e testemunha.

As folhas bífidas foram inoculadas na face inferior com *F. proliferatum* (Isolado SP-3, testado em trabalho anterior (COSTA JÚNIOR, 2013)) pelo método de injeção de uma suspensão de conídios, com auxílio de uma seringa com agulha fina (diâmetro de 0,4 mm). A suspensão de conídios foi infiltrada na folha até ser possível visualizar uma região de encharcamento. No tratamento testemunha foi realizado o mesmo procedimento infiltrando-se nas folhas apenas água esterilizada.

A inoculação do caule das mudas de pupunheira foi realizada com o método de ferimento na região basal, e deposição de uma microgota com 5 µL da suspensão (1×10^6 conídios.mL⁻¹) na região ferida. Esse ferimento foi realizado com agulha de diâmetro de 1,6 mm. Foi utilizado o isolado SP-3 de *F. proliferatum*.

A inoculação nas raízes foi realizada após as mesmas serem lavadas e, em seguida, injetou-se 20 µL de suspensão de conídios (1×10^6 conídios.mL⁻¹) nas três raízes mais novas, com uma seringa contendo uma agulha fina. O tratamento testemunha recebeu apenas uma injeção com água. Após a inoculação as mudas foram transplantadas.

Foram feitas avaliações semanais utilizando escala diagramática (Costa Júnior, 2013), determinando-se a severidade da doença. As notas variaram de 0 a 4, sendo 0 a planta sem sintomas, 1 planta com leve amarelecimento nas

extremidades das folhas, 2 planta apresentando em torno de 2 folhas necrosadas, 3 planta apresentando apenas uma folha verde, e 4 a planta morta.

1.2.4 Experimento 2 - Avaliação de agressividade de 31 isolados de *Fusarium* em caule de mudas de pupunheira.

Foi realizada a inoculação com ferimento no caule usando suspensão de conídios conforme descrito acima. A condução de 10 plantas por isolado foi em tubos de ensaio com água ultrapura (DIHAZI et al.(2012)), fazendo a reposição de água duas vezes por semana e mantidas á temperatura ambiente em casa de vegetação (Figura 1.1). Foram feitas avaliações semanais observando-se os sintomas externos e determinando-se a incidência e a severidade da doença com escala diagramática (COSTA JÚNIOR, 2013). Quando as plantas atingiram a nota quatro foi feito o reisolamento do patógeno fazendo-se a desinfestação de fragmentos do tecido lesionado (etanol 70% 30s; hipoclorito de sódio 1% por 1 min) e introduzidos em meio BDA. Ao final do experimento foi realizado um corte longitudinal no caule e as lesões internas foram medidas com paquímetro, no sentido longitudinal. As plantas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições sendo cada planta uma unidade experimental. Foi realizado o teste de Scott-Knot à 5% de significância, para as médias das cinco maiores lesões internas.



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 1.1 – PLANTAS DE PUPUNHEIRA COM RAÍZES INOCULADAS COM *F. proliferatum*, E MANTIDAS EM TUBOS DE ENSAIO CONTENDO ÁGUA ULTRAPURA.

1.2.5 Experimento 3- Comparação de métodos de inoculação de *Fusarium* em raízes de mudas de pupunheira.

Neste experimento foram avaliados quatro métodos de inoculação de *Fusarium* sp., conforme segue: a) Inoculação das raízes com injeção de suspensão de conídios. A inoculação das raízes com injeção foi realizada como descrito anteriormente, porém as plantas foram mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura e cultivadas em substrato comercial esterilizado. As plantas do tratamento testemunha receberam apenas injeção com água esterilizada; b) Imersão de raízes em suspensão de conídios. Nesse tratamento utilizou-se um béquer de aproximadamente 150 mL com suspensão de conídios (1×10^6 conídios.mL⁻¹) do patógeno, no qual as raízes, previamente cortadas foram mantidas completamente imersas por 5 minutos. Logo após as mudas foram plantadas nos

vasos com substrato esterilizado. A testemunha foi imersa em água esterilizada pelo mesmo período de tempo; c) Ferimento das raízes e inoculação de conídios sem transplante das mudas. Neste método, as plantas foram mantidas nos recipientes e a inoculação consistiu em realizar ferimentos superficiais nas raízes e, em seguida, adicionar 10 mL da suspensão de conídios (1×10^6 conídios.mL⁻¹) nesta região. As 10 plantas do tratamento testemunha receberam apenas água esterilizada; d) Inoculação com milho triturado colonizado com *F. proliferatum* adicionado ao substrato. Nesta inoculação, o milho triturado foi adicionado ao substrato na proporção de 40 g.dm⁻³ de milho triturado colonizado pelo fungo. Após misturar o inóculo ao substrato, as mudas com dois meses de idade foram plantadas, sendo previamente cortadas na região apical das raízes, com tesoura previamente flambada. As plantas do tratamento testemunha tiveram as raízes cortadas e foram plantadas em vasos contendo 40 g.dm⁻³ de milho triturado sem o fungo. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições.

1.2.6 Condições de condução e avaliação

As plantas foram mantidas em casa de vegetação e aos 120 dias as plantas foram, secas em estufa a 60°C e determinado o peso seco total, peso seco das raízes e peso seco das folhas e caule. Foi avaliado também o número de folhas de cada planta, altura e a severidade da doença. Esta última foi calculada dividindo-se a soma total das lesões pelo peso seco de raízes, com o objetivo de homogeneizar os resultados, uma vez que as plantas com uma pequena quantidade de raízes possuem relativamente uma menor área para ser colonizada pelo fungo.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se a patogenicidade de *F. proliferatum* em folhas, caule e raízes de pupunheira, observando o aparecimento de sintomas e reisolando-se o patógeno. Verificou-se que as espécies *F. proliferatum*, FOSC, *F. verticillioides*, FSSC e FFSC são patogênicas à pupunheira. Para o método de inoculação em raízes, o uso do milho triturado colonizado por *Fusarium* adicionado ao substrato foi efetivo. Este método permitiu o aumento da severidade da doença, reduzindo o nível de injúrias às plantas.

Aos sete dias após a inoculação (DAI), as folhas inoculadas com *F. proliferatum* apresentaram sintomas, caracterizados pelo escurecimento do limbo foliar e nervuras. (Figura 1.2 B).

Nos reisolamentos, verificou-se a presença de *F. proliferatum* em 100% dos fragmentos foliares. As folhas inoculadas apenas com água esterilizada não apresentaram sintomas. Apenas aos 15 DAI, as plantas inoculadas no caule com *F. proliferatum* apresentaram sintomas externos caracterizados pelo amarelecimento da folha bandeira similarmente à Fusariose observada no campo.

Aos 90 DAI, ao realizar o corte do caule, verificou-se internamente o escurecimento dos tecidos do caule (Figura 1.2 I). Algumas plantas do tratamento testemunha apresentaram amarelecimento da folha bandeira e, ao se realizar cortes no caule, verificou-se internamente o escurecimento dos tecidos da região de inoculação (Figura 1.2-H) não se verificando evolução de sintomas da região injuriada.

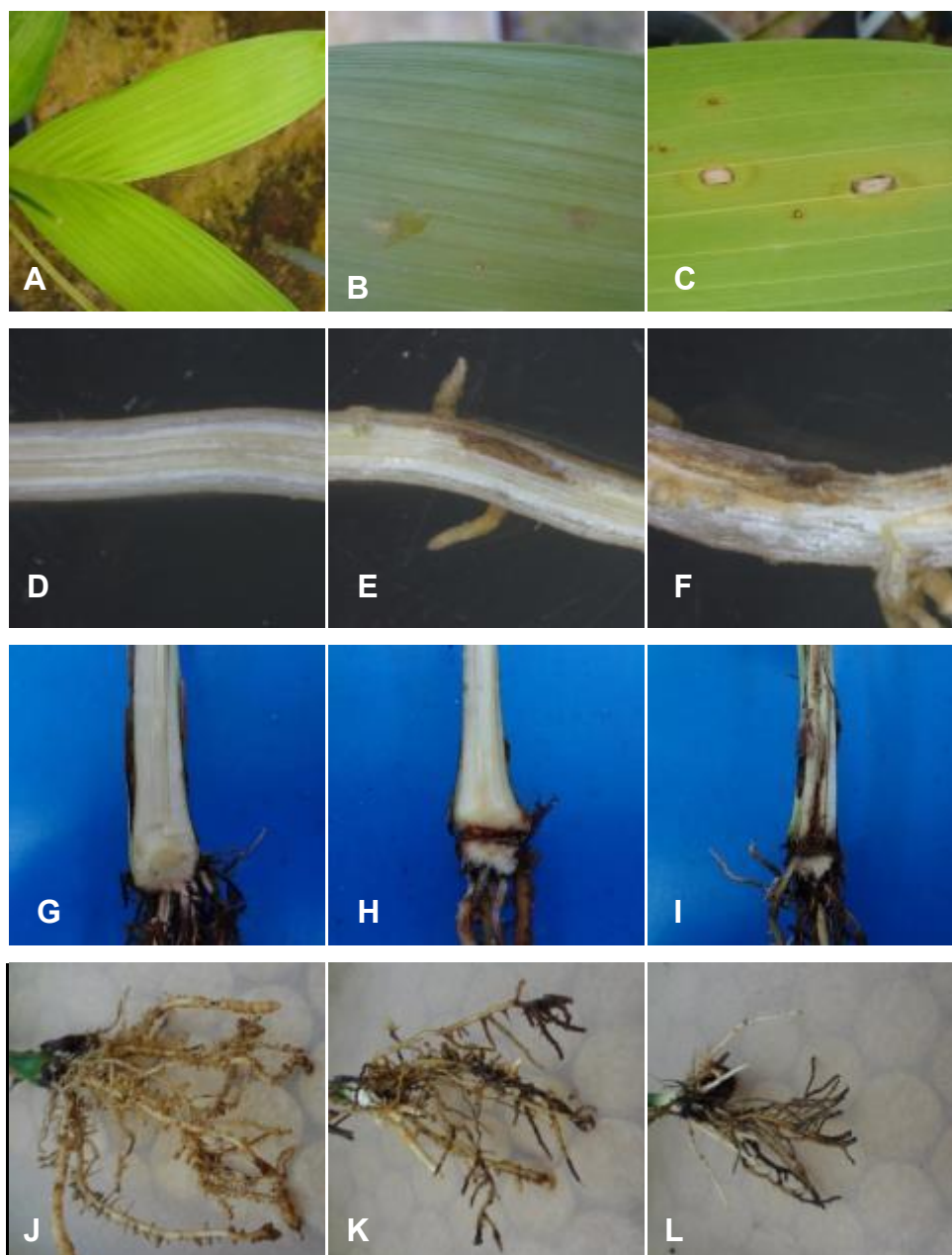
As plantas inoculadas nas raízes com *F. proliferatum* apresentaram lesões que atingiram 15,2 cm (Figura 1.2-F). Não se verificou sintomas reflexos na parte superior das plantas inoculadas. Os isolados SP-3 e SP-5 apresentaram lesões nas raízes de até 15,21 mm e 12,3 mm de comprimento, respectivamente. Nos reisolamentos verificou-se a recuperação de 80% de *F. proliferatum* nas plantas inoculadas. As plantas do tratamento testemunha apresentaram apenas escurecimento na região do ferimento de inoculação (Figuras 1.2 E, H, K).

TABELA 1.1 – AGRESSIVIDADE E ORIGEM DE 31 ISOLADOS DE *Fusarium proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* E *Fusarium* sp. DE PUPUNHEIRA, UTILIZANDO-SE INOCULAÇÃO COM FERIMENTO NO CAULE E CONDUÇÃO DAS MUDAS EM TUBOS DE ENSAIO COM ÁGUA.

Espécie	Isolado	Origem	Sintomas externos		Sintomas internos		
			INC(%)	SEV1	INC(%)	SEV2*	
	Testemunha		A	B	A	4.2	b ^{B*}
<i>F. proliferatum</i>	SP – 5	RO	30	1.2	50	17.6	a
	Fus – 13	PR	0	0	30	6.6	b
	SP – 3	RO	0	0	100	15.5	a
	Fus – 12	PR	0	0	70	12.3	a
	Fus – 2	PR	0	0	60	11.6	a
	GA – 3	SC	20	0.8	60	11.4	b
	SAF – 2	PR	10	0.4	30	4.1	b
	CA – 1 A	SP	50	2	60	9.6	b
	SP - 3HR	RO	10	0.1	50	6.2	b
	SAF – 4	PR	30	1.2	80	11.4	a
	SAF – 7	PR	0	0	80	13.4	a
	SAF – 8	PR	0	0	80	7.6	b
<i>F. oxysporum</i> sp. cpx.	1 A	RO	20	0.6	50	19.6	a
	1A02E	RO	30	0.6	100	30.3	a
	A7	RO	10	0.4	40	4.3	b
	BG – 11	PR	10	0.1	80	11.1	a
	GA – 1	SC	20	0.3	60	19.3	a
	BG – 14	MG	80	2.4	60	4.3	b
	CA - 1B	SP	0	0	40	6.3	b
	CA – 2	SP	10	0.4	90	14.2	a
<i>F. verticillioides</i>	3 A	RO	10	0.2	50	13.2	a
<i>F. solani</i> sp. cpx	BG – 13	PR	0	0	50	13.0	a
	SP – 2	RO	20	0.6	50	4.6	b
<i>F. fujikuroi</i> sp. cpx.	BG – 21	PR	20	0.8	80	7.3	b
	BG – 2	PR	0	0	50	6.5	b
	SAF – 5	PR	10	0.2	70	15.3	a
	BG – 12	PR	10	0.4	50	4.2	b
	CA – 3	SP	0	0	60	13.5	a
	BG – 15	PR	20	0.6	60	10.2	a
	SAF – 6	PR	0	0	50	9.0	b
	SAF – 3	PR	0	0	100	21.1	a
Coeficiente de Variação %							43,4

FONTE: O autor (2015).

INC- Incidência (percentual de plantas com sintomas); SEV1-Escala com notas variando de 0 a 4; SEV2-Tamanho de lesão no caule (mm); *Números seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, teste de Scott-Knot, $p < 0,05$; A - Plantas do tratamento testemunha sofreram injúrias no momento da inoculação levando algumas plantas a morte; B - Devido às injúrias ocorridas na testemunha as plantas apresentaram amarelecimento das folhas (SEV1) ou escurecimento no local do ferimento (SEV2). Experimento repetido duas vezes com os isolados BG-14; SAF-7 e CA-1A



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 1.2. A) TRATAMENTO TESTEMUNHA -FOLHA DE PUPUNHEIRA INOCULADA COM ÁGUA B) SINTOMAS EM FOLHA INOCULADA COM *Fusarium proliferatum* AOS 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO (DAÍ); C) SINTOMAS NA FOLHA AOS 15 DAÍ; D) TRATAMENTO TESTEMUNHA - RAZI NÃO INOCULADA EM CORTE LONGITUDINAL (AUMENTO 7,5X); E) CONTROLE COM RAZI INOCULADA COM ÁGUA (AUMENTO 7,5X); F) SINTOMAS EM RAZI INOCULADA COM *F. proliferatum* (AUMENTO 7,5X); G) CONTROLE COM CAULE NÃO INOCULADO VISTA EM CORTE; H) CONTROLE COM CAULE INOCULADO COM ÁGUA; I) CAULE INOCULADO COM *F. proliferatum*; J) RAÍZES DA TESTEMUNHA PARA O EXPERIMENTO CONDUZIDO EM SUBSTRATO; K) RAÍZES DO TRATAMENTO COM MILHO TRITURADO SEM FUNGO (CONTROLE); L) RAÍZES DAS PLANTAS INOCULADAS COM *F. proliferatum* USANDO MILHO TRITURADO.

Neste trabalho, as folhas, caule e raízes foram suscetíveis à *F. proliferatum*. Embora seja um patógeno de solo (LESLIE & SUMMERELL, 2006), a ocorrência de *Fusarium* como patógeno foliar já foi relatada em outras palmeiras, como a tamareira (HODEL, 2009). No entanto, esta é a primeira observação da suscetibilidade foliar da pupunheira ao patógeno. Devido a praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, o método de inoculação foliar mostrou-se viável para demonstrar a patogenicidade de *Fusarium* entretanto, tem o inconveniente de não reproduzir os sintomas típicos da Fusariose, como amarelecimento completo das folhas até morte da planta.

A inoculação do caule com ferimentos reproduziu os sintomas típicos da Fusariose, que se caracteriza pelo amarelecimento da folha bandeira, seguido do amarelecimento das demais folhas (Tabela 1.1). No entanto, os ferimentos provocados durante a inoculação causaram a morte de até 50 % das plantas. Observou-se que, nos cortes longitudinais realizados no caule, a região inoculada localizava-se próxima ao meristema apical, provocando danos irreversíveis à planta, conforme demonstrado no trabalho de MOSSANEK (2013). Outro aspecto que chamou atenção neste método foi o aparecimento de plantas inoculadas com *Fusarium* que externamente apresentaram-se assintomáticas. No entanto, em cortes longitudinais realizados nos caules destas plantas, observou-se lesões que atingiram até 95 mm. Esta informação é importante para os casos de disseminação do patógeno por mudas assintomáticas em viveiros. Nos reisolamentos, verificou-se a presença de *Fusarium* nos fragmentos de caule oriundos das plantas do tratamento testemunha. A origem endofítica de *Fusarium* já foi anteriormente relatada em pupunheira por Almeida et al., (2005) em ápices caulinares. Outros autores também têm relatado em outros hospedeiros a presença de fungos fitopatogênicos como endofíticos tais como *Deightonella torulosa* e *Colletotrichum* spp. em banana e manga, respectivamente (PHOTITA et al., 2004; VIEIRA et al., 2014).

O método de inoculação em plantas mantidas em tubos de ensaio com água adaptado de DIHAZI et al., (2012) permitiu que as plantas fossem mantidas viáveis por até 90 dias (HASSNI et al., 2007). A vantagem desse método é permitir conduzir os trabalhos em condições controladas e visualizar a evolução dos sintomas nas plantas. As plantas inoculadas com *Fusarium* apresentaram sintomas típicos da doença, caracterizados por amarelecimento das folhas progredindo até a morte da

planta. Neste método, a incidência variou de 10 a 80% de um total de 10 mudas, sendo os isolados de *Fusarium* BG-14 e CA-1A, os mais agressivos nos sintomas externos. Neste experimento, no tratamento testemunha, algumas plantas apresentaram amarelecimento da folha bandeira, chegando a causar a morte de 50% das plantas. Este comportamento já foi observado em outros trabalhos quando se utilizou o método de inoculação com ferimento no caule da muda de pupunheira (COSTA JÚNIOR, 2013). Esta situação é mais comum quando se utiliza métodos que causam injúrias, e a morte da planta é resultado dos danos causados no ápice do estipe da planta (MOSSANEK, 2013) (Figura 1.2 H), conforme abordado anteriormente.

Nos cortes longitudinais do caule das mudas inoculadas com *Fusarium*, verificou-se que plantas assintomáticas apresentavam sintomas internos caracterizados pelo escurecimento dos tecidos (Figura 1.2-I). Avaliações de *F. proliferatum* em *Phoenix dactylifera* L. também foram realizadas três meses após a inoculação, demonstrando que doenças envolvendo *Fusarium* em palmeiras podem ter seu avanço lento para demonstração dos sintomas externos (ABDALLA et al., 2000).

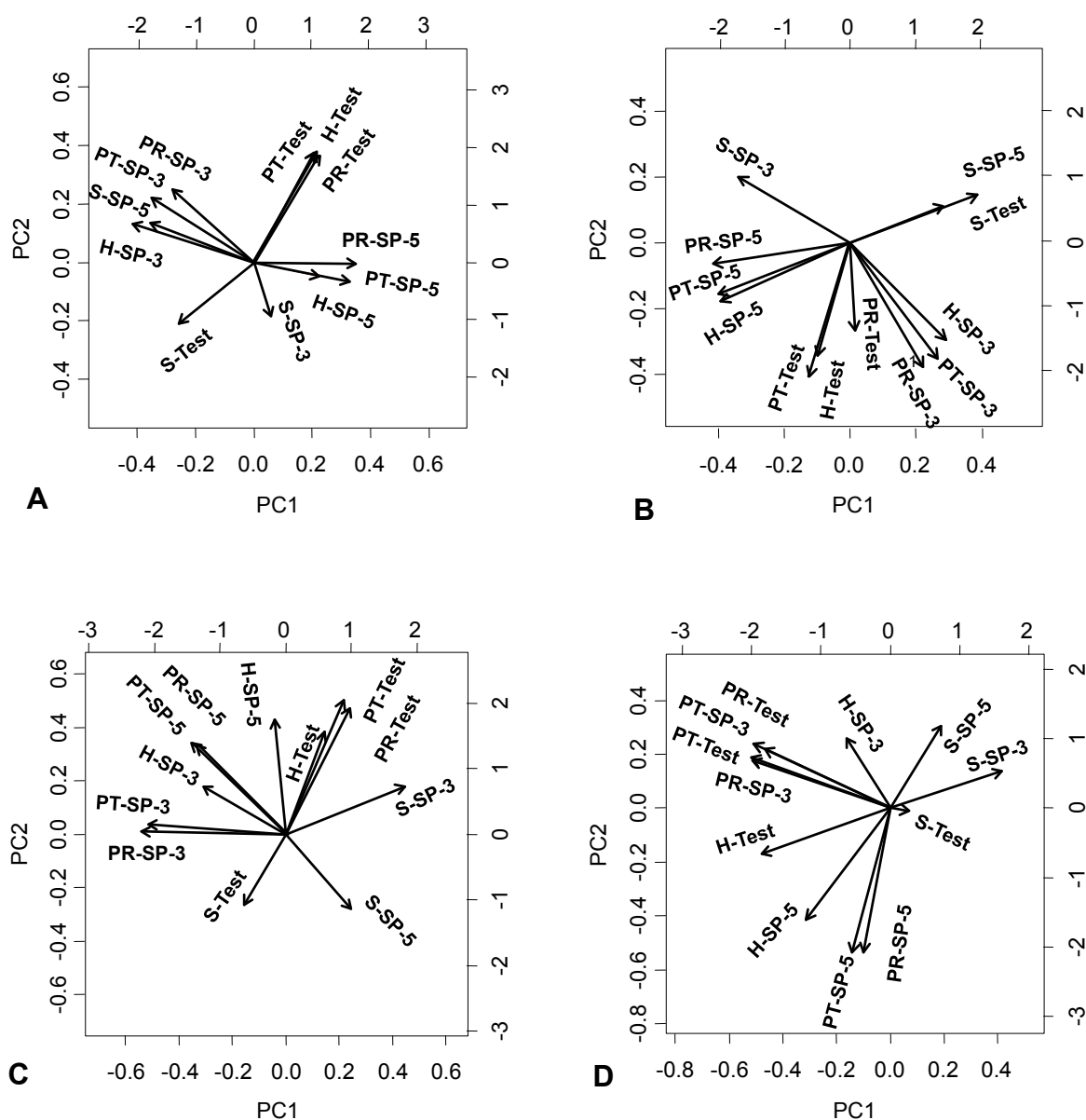
O isolado CA-1A de *Fusarium* que inicialmente foi um dos mais agressivos, no segundo experimento não manteve o mesmo comportamento. A mesma observação foi verificada para o isolado SAF-7. O isolado BG-14 manteve o mesmo comportamento nos dois experimentos. Esse comportamento para alguns isolados de *Fusarium* devido às inconsistências dos métodos de inoculação por ferimentos no caule, já foram relatados por outros autores em pupunheira (PIZZINATO et al., 2001; COSTA JÚNIOR, 2013).

Na comparação dos quatro métodos de inoculação (Figura 1.3) – injeção, imersão, ferimentos e milho triturado incorporado ao substrato - a análise de componentes principais (ACP) mostrou a influência dos tratamentos sobre as variáveis resposta, em que os vetores de severidade estão posicionados em direção oposta aos vetores que indicam crescimento da planta (Altura, Peso seco de raízes e Peso seco total). Quanto mais próximo à origem menor a contribuição da variável para a análise, e os vetores de severidade relativa para testemunha (S-Test) estiveram sempre mais próximos à origem do que os vetores de severidade para os isolados (S-SP-3, S-SP-5), exceto para o método de injeção (Figura 1.3). Estes

resultados indicam que esse método causa maior injúria na testemunha, comparada aos sintomas das plantas inoculadas.

Em todos os tratamentos as componentes principais 1 e 2 explicaram a maior parte da variância total com proporções de 67% até 79%, valores semelhantes aos obtidos por KUHNEM JÚNIOR et al., (2013) que explicou 74,5% da variância total entre isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho. Neste trabalho, o isolado SP-3 de *F. proliferatum* quando inoculado utilizando o método milho triturado resultou em menor altura das plantas atingindo 72 mm, comparado com a testemunha 76 mm. As demais variáveis analisadas, peso seco total e peso seco de raízes também deram o mesmo indicativo de que a inoculação com milho triturado colonizado reduziu o crescimento das plantas, sem afetar a testemunha uma vez que o auto-valor de severidade neste tratamento para a testemunha foi muito baixo, 0,05 na componente principal 1. O tratamento imersão de raízes comportou-se satisfatoriamente, entretanto os auto-valores para testemunha foram bem mais altos (0,27). A redução do crescimento após a inoculação com *F. verticillioides* via solo é conhecida para o patossistema em milho, principalmente em altos níveis do inóculo (GLENN et al., 2008; COSTA et al., 2012).

O método de ferimento de raízes foi o menos agressivo, por não realizar transplante das mudas durante a inoculação e, com isso, causar menos ferimentos nas raízes o que resultou em plantas maiores, com maior peso seco; no entanto, neste tratamento verificou-se menor severidade da doença o que não é desejável para um método de inoculação. O peso seco de raízes reduziu no tratamento com milho triturado colonizado, sendo que as plantas apresentaram em média 0,13 g de raízes para os isolados SP-3. Isso pode ser explicado como resultado da colonização das raízes por *F. proliferatum* (Figura 1.2 D-F) o qual necessita de um substrato para seu estabelecimento e sobrevivência até o momento da colonização (COSTA et al., 2012).



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 1.3 – BILOT DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (CP) PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS RESPOSTA ALTURA (H), PESO TOTAL (PT), PESO DE RAÍZES (PR) E SEVERIDADE (S) PARA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO COM OS TRATAMENTOS SP-5 E SP-3 (ISOLADOS) E TESTEMUNHA (TEST) PARA OS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO: A) INJEÇÃO, B) IMERSÃO, C) FERIMENTO, D) QUIRERA.

1.4 CONCLUSÕES

Fusarium proliferatum foi capaz de causar lesões em folhas, caule e raízes de pupunheira;

F. proliferatum, complexo de espécies *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, complexo de espécies *F. solani* e complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* foram patogênicas à pupunheira;

O método de inoculação de raízes com milho triturado colonizado com *Fusarium* foi o mais adequado para trabalhos com a Fusariose em pupunheira;

1.5 REFERENCIAS

ABDALLA, M.Y. et al. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from Date Palm in Saudi Arabia. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.321-324, 2000.

ALMEIDA, C.V. de et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40, n.5, p.467-470, 2005.

ALVES, S.A.R. et al. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a Podridão do Estipe da Pupunheira no Paraná. **Boletim Pesquisa Florestal**, v.52, p.133-140, 2006.

COSTA JÚNIOR, J.C. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pupunheira submetidas a tratamento químico e caracterização dos sintomas da podridão da base do estipe causada por *Fusarium* spp.** 2013. Curitiba: UFPR. 127p (Dissertação Mestrado).

COSTA JÚNIOR, J.C. da et al. Qualidade Sanitária e Fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. E tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1119-1131. 2016.

COSTA, R.V. et al. Metodologia para avaliação da reação de genótipos de milho à *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação. **Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo**, v.179, p.1-7, 2012.

DIHAZI, A. et al. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings. **Plant Physiol. Biochem**, v.55, p.7-15, 2012.

GEISER, D.M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology** v. 103, p.400-408, 2013.

GLENN, A.E. et al. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **MPMI**, v.21, n.1, p.87-97, 2008.

HASSNI, M. et al. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, n.2, p.224-234. 2007.

HODEL, D.R. 2009. Palm diseases in the landscape: Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. Davis: **Pest notes**, publication 74148: 1-6.

KLINGELFUSS, L.H. et al. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira** v.32, n.1, p.50-55, 2007.

KUHNEM JÚNIOR, P.R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural** v.43, n.4, p.583-588, 2013.

LESLIE, J; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. USA: Iowa, 2006.

MOSSANEK, E.A.O. **Indução de perfilhamento em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson)**, 2013. Curitiba: UFPR. 55p. (Dissertação de Mestrado).

PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.

PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p. 131-140, 2004. Available from: < <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/16-4.pdf> > Accessed: Mar. 15, 2017.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

SANTOS, A.F. et al. **Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

VIEIRA, W.A.S. et al. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal diversity**, v.67, p. 181-202, 2014. doi:10.1007/s13225-014-0293-6

CAPÍTULO 2 – COMPACTAÇÃO DE SOLO COMO UM FATOR DE PREDISPOSIÇÃO À FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA

RESUMO

A compactação de solos é um fator limitante para o crescimento de diversas culturas. A Fusariose (*Fusarium* spp.), uma das principais doenças da pupunheira, causa o amarelecimento das folhas progredindo até a morte das plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de três níveis de compactação de solo na incidência e severidade da fusariose da pupunheira e no crescimento das plantas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos feitos a partir de anéis de PVC (diâmetro de 150 mm) preenchidos com solo da camada de 0-20 cm de um Latossolo Vermelho amarelo do município de Quatro Barras/PR. O solo apresentava densidade aparente de $0,9 \text{ Kg dm}^{-3}$ e foi infestado com milho triturado colonizado por *Fusarium proliferatum* na dose de 40 g.dm^{-3} de milho triturado colonizado. O inóculo foi preparado a partir do isolado SP-3 de *Fusarium proliferatum*. Para inoculação o milho triturado colonizado com *F. proliferatum* foi misturado ao solo. Esta dose foi determinada previamente em experimento com 40, 80, 120 e 160 g de milho triturado colonizado com *F. proliferatum* por dm^{-3} de solo. As plantas foram avaliadas semanalmente por um período de quatro meses com escala de notas variando de 0 a 4. As plantas foram avaliadas semanalmente quanto a evolução dos sintomas. A compactação do solo aumentou em 20% a mortalidade de plantas atacadas pela fusariose comparativamente à testemunha. O crescimento das plantas também foi reduzido em 37% nas plantas do tratamento com maior nível de compactação. Desta forma conclui-se que a compactação de solo é um fator que contribui com a severidade da fusariose da pupunheira.

PALAVRAS-CHAVE: *Fusarium*, *Bactris gasipaes*, Patógeno de solo.

CHAPTER 2 – SOIL COMPACTION AS A FUSARIOSE PROBATION FACTOR OF PUPUNHEIRA

ABSTRACT

Compaction of soils is a limiting factor for the growth of several crops. *Fusarium* (*Fusarium* spp.) is one of the main diseases of peach palm, causing the yellowing of the leaves progressing to death with reduction of the plant stand. The objective of this work was to evaluate the influence of three levels of soil compaction on the incidence and severity of fusariosis of peach palm and plant growth. The experiment was conducted in a greenhouse in pots made from PVC rings filled with soil from the 0-20 cm layer of a Yellow Red Latosol of the municipality of Quatro Barras / PR. The soil had an apparent density of 0.9 kg dm^{-3} and was infested with chambers colonized by *Fusarium proliferatum* at the dose of 40 g.dm^{-3} before pressing and planting. The inoculum was prepared from SP-3 isolate of *Fusarium proliferatum*. For inoculation the ground corn colonized with *F. proliferatum* was mixed to the soil. This dose was determined previously in an experiment with 40, 80, 120 and 160 g of ground corn colonized with *F. proliferatum* per dm^{-3} of soil. The plants were evaluated weekly for a period of four months with a scale of grades varying from 0 to 4. The plants were evaluated weekly for the evolution of symptoms. Soil compaction increased by 20% the mortality of plants attacked by fusariosis compared to the control. Plant growth was also reduced by 37% in treatment plants with the highest level of compaction. In this way, it is concluded that soil compaction is a factor that contributes to the severity of the fusariosis of peach palm.

Key-words: *Bactris gasipaes*, *Fusarium*, Soil pathogen.

2.1 INTRODUÇÃO

A expansão dos plantios de pupunheira (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Henderson) para produção de palmito vem crescendo nos últimos anos em vários estados brasileiros, tais como Bahia, Goiás, São Paulo, Mato Grosso e Santa Catarina, atingindo 20.000 ha, em 2014 e uma produção aproximada de 116 mil toneladas (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). Sua importância se deve principalmente à substituição do palmito juçara (*Euterpe edulis* Martius), explorado de forma extrativista na Mata Atlântica, por um palmito cultivado que permite cortes sucessivos por vários anos (SANTOS et al., 2008).

A fusariose, (*Fusarium* spp.) é uma das principais doenças da pupunheira, cujos sintomas se caracterizam pelo amarelecimento das folhas progredindo até a morte da planta (PIZZINATTO et al., 2001). Esta doença encontra-se disseminada nas principais regiões produtoras brasileiras e, alguns autores, têm demonstrado sua transmissão através de sementes (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2011; COSTA JÚNIOR et al., 2016). De acordo com Costa Júnior et al. (2016) a doença pode representar uma limitação ao cultivo da pupunheira.

Com a expansão dos plantios de pupunheira tem sido utilizadas áreas de pastagens ou solos compactados para o cultivo desta planta, sendo observado frequentemente a associação entre o preparo de solo deficitário e a presença da fusariose. Embora não se conheça na pupunheira a correlação entre a compactação do solo com a incidência e a severidade da fusariose, em outros patossistemas esta associação já foi demonstrada, como é o caso do feijoeiro (CICHY et al., 2007), ervilha (KRAFT & BOGE, 2001) e soja (CHONG et al., 2004), assim como para outras doenças radiculares como hérnia das crucíferas (GOSSEN et al., 2016) e meloidoginose (GANJI et al., 2013).

A compactação de solos é um fator limitante para o crescimento da planta, pois influencia diversos processos fisiológicos como a taxa fotossintética, tornando as plantas mais predispostas à infecção de fitopatógenos (SOUZA et al., 2012; SILVA & ROSOLEM, 2002; FOLONI et al., 2003, RODRIGUES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2005). Faltam estudos desta natureza para a pupunheira.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de dois níveis de compactação de solo na incidência e severidade da fusariose da pupunheira e no crescimento das plantas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em laboratórios e casa de vegetação da Embrapa Florestas, Colombo-PR.

Foram utilizados vasos feitos a partir de tubos de PVC, com 150 mm de diâmetro e 350 mm de altura. Como substrato utilizou-se solo coletado da camada de 0-20 cm de um Latossolo Vermelho amarelo distrófico (LVad) do município de

Quatro Barras-PR. O solo apresentou densidade aparente de $0,9 \text{ Kg dm}^{-3}$ e as características físico químicas apresentadas na Tabela 2.1.

O solo foi peneirado em malha de 10 mm e seco á temperatura ambiente até atingir peso constante, por cerca de 15 dias. Em seguida, o substrato foi submetido à ação de uma prensa hidráulica e obtendo-se três níveis de compactação correspondentes as densidades de 0,9; 1,1 e $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$, conforme metodologia de Silva & Rosolem (2002) (Figura 2.1). O tratamento correspondente ao solo sem compactação ($0,9 \text{ kg dm}^{-3}$) foi determinado em amostra prévia, pelo método da proveta (EMBRAPA, 1997). A altura da camada de solo de cada vaso foi ajustada de modo a obter-se o mesmo volume de solo por vaso (RODRIGUES et al., 2008).

TABELA 2.1. ANÁLISE QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DA CAMADA 0-20 CM DE UM LATOSSOLO Vermelho Amarelo distrófico (LVAd) UTILIZADO PARA O PLANTIO DAS MUDAS.

Horizonte	----- pH -----		Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	P	C	V	m	Ca/Mg
	CaCl ₂	SMP	----- cmolc dm ⁻³ -----						mg dm ⁻³	g dm ⁻³	%	%		
A	5,1	5,4	0,1	7,8	5,1	3,6	0,2	8,9	16,7	4,5	35,8	53	1	1,4
Horizonte	Areia		Silte		Argila		Atividade da Argila				Silte / Argila			
	----- g kg ⁻¹ -----						cmolc kg ⁻¹				(adimensional)			
A	388		150		463		36.0				0.3			

FONTE: O autor (2016).

A umidade do solo para imprimir o efeito da compactação o solo foi de 17-19 % (ROSOLEM & SILVA, 2002). A umidade do solo foi monitorada diariamente até atingir o teor desejado. A umidade final foi determinada com base na média de 10 amostras, secas em estufa, estabelecendo-se uma percentagem entre o peso úmido inicial (20 g) e o peso após secagem (Tabela 2.2).

TABELA 2.2 – NÍVEIS DE UMIDADE DO SOLO ANTES DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO DE COMPACTAÇÃO DETERMINADOS PELO PESO ÚMIDO (PU) EM RELAÇÃO AO PESO SECO (PS) ATÉ PESO CONSTANTE EM ESTUFA (60° C).

Amostra	Pu (g)	Solo + recipiente (g)	Ps (g)	Peso final (g)	Umidade %
1	20	153,60	136,51	17,09	17,03
2	20	39,97	23,13	16,84	18,76
3	20	67,37	50,75	16,62	20,34
4	20	64,51	47,51	17,00	17,65
5	20	67,76	50,65	17,11	16,89
6	20	63,39	46,55	16,84	18,76
7	20	68,91	52,22	16,69	19,83
8	20	48,83	31,83	17,00	17,65
9	20	44,38	27,44	16,94	18,06
10	20	45,41	28,68	16,73	19,55

FONTE: O autor (2016).

Os níveis de compactação foram determinados em experimento preliminar, com quatro repetições onde foram colocados anéis volumétricos (50mm x 30mm) dentro da massa de solo que sofreu prensagem para determinar a densidade de solo pelo método do anel volumétrico (Tabela 2.3) (FOLONI et al., 2003).

A partir do plantio das mudas, procederam-se irrigações, a cada dois dias visando manter o solo próximo a capacidade de campo. A irrigação era interrompida ao primeiro sinal de drenagem, conforme metodologia de SOUZA et al. (2012) e RODRIGUES et al. (2008).

A resistência mecânica do solo a penetração, correspondente aos níveis de compactação foi determinada antes do plantio com um penetrômetro, em que os níveis pré-determinados de densidade foram correlacionadas com os resultados de resistência de penetração (Figura 2.2)(FOLONI et al., 2003).

O inóculo foi preparado a partir do isolado SP-3 de *Fusarium proliferatum* em sacos autoclaváveis contendo um quilograma de milho triturado previamente autoclavado (127° C, 30 min) e umedecida com água. Em cada saco foi colocado 10 discos (5 mm de diâmetro) de meio SNA (Synthetic nutriente ágar) com micélio de *F. proliferatum* em crescimento ativo e mantido a 24°C, no escuro, por 20 dias. Neste período, o inóculo atingiu uma concentração que variou de 1,7 a 4,2 x 10⁷ conídios por grama de milho triturado.



FONTE: O autor (2016).

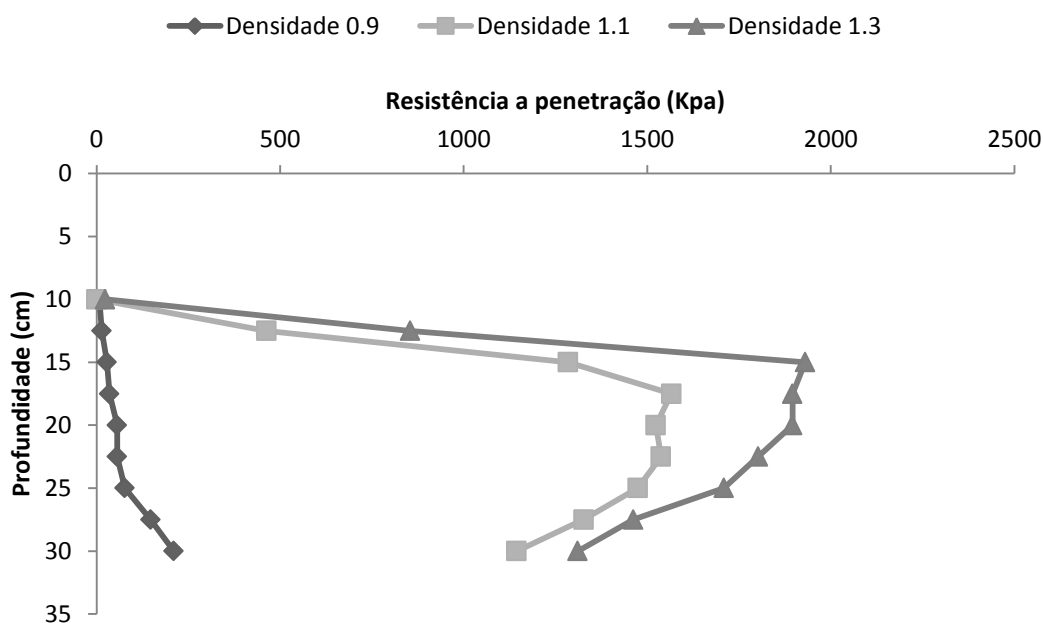
FIGURA 2.1 – PROCEDIMENTO PARA COMPACTAÇÃO DO SOLO UTILIZANDO PRENSA HIDRÁULICA E VASOS FEITOS DE TUBOS DE PVC, ATÉ IMPRIMIR O VOLUME CORRESPONDENTE À DENSIDADE DE COMPACTAÇÃO.

TABELA 2.3 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE DO SOLO (D) DETERMINADA PELO MÉTODO DOS ANÉIS VOLUMÉTRICOS (AV) E A DENSIDADE DE SOLO ESTIMADA PARA OS TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO COM QUATRO REPETIÇÕES.

Nível de compactação Kg.dm^{-3}	Peso total (g)	Peso AV (g)	Peso de solo (g)	Volume AV (cm^3)	D (Kg.dm^{-3})	D média (Kg.dm^{-3})
0,9	195,47	135,72	59,75	65	0,919	0,89
0,9	174,81	116,68	58,13	65	0,894	
0,9	219,2	161,18	58,02	65	0,893	
0,9	206,06	150,32	55,74	65	0,857	
1,1	227,56	158,7	68,86	65	1,059	1,09
1,1	210,35	137,47	72,88	65	1,121	
1,1	234,86	163,4	71,46	65	1,099	
1,1	219,3	148,94	70,36	65	1,082	
1,3	234,54	152,83	81,71	65	1,257	1,25
1,3	229,85	148,64	81,21	65	1,249	
1,3	228,24	149,19	79,05	65	1,216	
1,3	228,77	146,77	82	65	1,261	

FONTE: O autor (2016).

Para inoculação o milho triturado colonizado com *F. proliferatum* foi misturado ao solo e a concentração de inóculo utilizada foi de 40 g.dm⁻³ de solo. Esta dose foi determinada previamente em experimento com 40, 80, 120 e 160 g de milho triturado colonizado com *F. proliferatum* por dm⁻³ de solo. O delineamento foi inteiramente casualizado com 10 repetições, em vasos de 1 dm³, sendo que cada repetição continha um vaso com uma planta.



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 2.2 – RESISTÊNCIA A PENETRAÇÃO MEDIDA COM PENETRÔMETRO, EM TRÊS NÍVEIS DE DENSIDADE DE COMPACTAÇÃO DO SOLO (0,9, 1,1 E 1,3 KG DM³) NA PROFUNDIDADE DE 10 A 30 CM.

Em cada vaso foi plantada uma muda de pupunheira, com quatro meses de idade, que teve suas raízes lavadas e cortadas nas extremidades com tesoura previamente flambada. O solo foi previamente misturado com ao milho triturado colonizado antes da compactação. Nos tratamentos mais compactados, o plantio foi realizado fazendo-se um pequeno buraco que comportasse as raízes da muda, sem desmanchar a camada compactada. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, fazendo a rega de duas vezes por semana até os vasos apresentarem o primeiro sinal de drenagem.

Previamente determinou-se em dez mudas a altura da plântula, número de folhas, diâmetro do colo, peso fresco total, peso fresco de raízes, peso seco de

raízes e peso seco de caule + folhas (Tabela 2.4). Este experimento foi repetido duas vezes, a primeira vez em fevereiro de 2016 e a segunda em outubro de 2016.

As plantas foram avaliadas semanalmente quanto a severidade, por um período de 150 dias com escala de notas de severidade variando de 0 a 4, sendo 0 a planta sem sintomas, 1 planta com leve amarelecimento nas extremidades das folhas, 2 planta apresentando em torno de 2 folhas necrosadas, 3 planta apresentando apenas uma folha verde, e 4 a planta morta (COSTA JÚNIOR, 2013).

Foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição um vaso com uma planta, com 6 tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado.

TABELA 2.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS MUDAS DE PUPUNHEIRA NO MOMENTO DA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO, PARA AS VARIÁVEIS PESO TOTAL SECO (PTS), PESO SECO DE RAÍZES (PSR), NÚMERO DE FOLHAS (NF), DIÂMETRO DO CAULE A ALTURA DE 1,5 CM (DC), ALTURA DA PLANTA (H) E PESO FRESCO (PF).

Variável	PTS (g)	PSR (g)	NF	DC (mm)	H (mm)	PF (g)
Média	2,7	0,396	3	87,23	98,57	11,24
Amplitude	2,2 - 3,7	0,1 - 0,6	3 - 3	74,4 - 116,4	74 - 116,4	8,7 - 15,6

FONTE: O autor (2017).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se que a compactação do solo reduziu o crescimento das plantas de pupunha, sendo que no nível de compactação $1,3 \text{ Kg.dm}^{-3}$ as plantas não apresentaram ganho de matéria seca após um período de 150 dias (Tabela 2.6). A severidade da fusariose foi maior quando as plantas foram submetidas a compactação do solo, sendo que no tratamento não compactado a doença não chegou a se expressar e na maior compactação o número de plantas mortas chegou a 20%.

Verificou-se que, a quantidade de inóculo utilizando milho triturado colonizado por *Fusarium* mais adequada para experimentos envolvendo a compactação do solo é a de 40 g.dm^{-3} , pois, nesta dose a severidade da doença foi menor, possibilitando a avaliação da influência do fator compactação do solo (Tabela 2.5, Figura 2.3).

A dose de 40 g.dm⁻³ de milho triturado colonizada por *Fusarium* apresentou uma das menores severidades, já a dose de 160 g.dm⁻³ apresentou severidade de 3,5 ao final do experimento (Figura 2.3). Outro dado observado é que a menor dose (40 g.dm⁻³) não afetou o crescimento das plantas. No entanto, doses mais elevadas (160 g.dm⁻³) reduziram o crescimento das plantas comparativamente à testemunha (Tabela 2.5). Desta forma foi escolhida a menor dose para inoculação do experimento de compactação, a fim de possibilitar a maior expressão de sintomas sobre o efeito desejado das condições do solo, e não influenciar o crescimento da planta. Pois uma dose que fosse muito severa sem o efeito adicional da compactação, mostraria menores diferenças entre o tratamento controle e o solo compactado. Patógenos de solo como *Sclerotium rolfsii* tendem a aumentar a incidência quando se aumenta a concentração de inóculo, como pode ser observado por BARBOSA et al.(2010), chegando a níveis próximos de 100% o que seria indesejável quando se quer avaliar o efeito adicional da compactação.

TABELA 2.5 – CRESCIMENTO DAS PLANTAS DE PUPUNHEIRA EM QUATRO DOSES DE MILHO TRITURADO (40, 80, 120, 160 g.dm⁻³) COM E SEM *Fusarium proliferatum*.

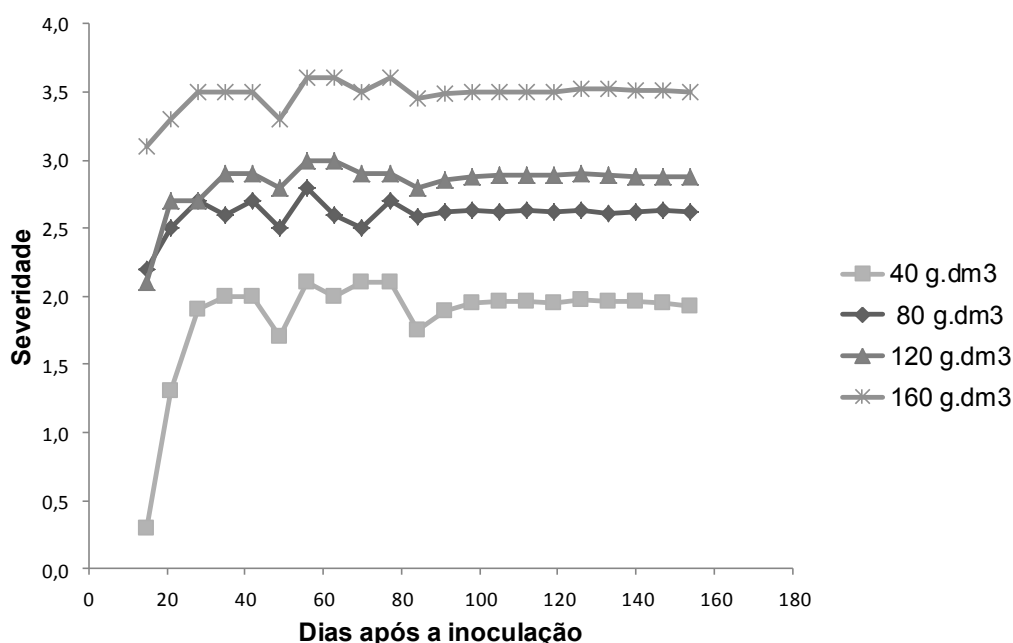
Tratamento	Massa fresca total (g)		Massa seca total (g)		Massa seca raiz (g)	
Testemunha*	12,9	abc	5,2	a	1,1	a
Testemunha**	11,4	abcd	4,5	ab	1,0	a
Milho triturado 40 g s/ <i>Fusarium</i>	8,8	bcde	3,8	ab	0,8	a
Milho triturado 80 g s/ <i>Fusarium</i>	11,5	de	5,0	a	1,0	a
Milho triturado 120 g s/ <i>Fusarium</i>	6,6	de	2,8	b	0,5	a
Milho triturado 160 g s/ <i>Fusarium</i>	6,6	cde	3,2	ab	0,5	a
Milho triturado 40 g c/ <i>Fusarium</i>	14,8	abc	5,6	a	1,2	a
Milho triturado 80 g c/ <i>Fusarium</i>	8,2	cde	3,6	ab	0,6	a
Milho triturado 120 g c/ <i>Fusarium</i>	5,1	de	2,5	b	0,4	a
Milho triturado 160 g c/ <i>Fusarium</i>	5,3	de	3,2	ab	0,4	a

FONTE: O autor (2016).

*Testemunha transplantada com cortes das raízes;

**Testemunha transplantada sem corte de raízes.

Letras seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de tukey (p=0,05).



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 2.3 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA EM QUATRO DOSES DE INÓCULO (40, 80, 120 E 160 G DE MILHO TRITURADO COLONIZADO COM *Fusarium proliferarum* POR dm^{-3} DE SOLO), POR UM PERÍODO DE 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO. SEVERIDADE VARIANDO DE 0 (AUSÊNCIA DE SINTOMAS) A 4 (PLANTA MORTA), SENDO 0 A PLANTA SEM SINTOMAS, 1 PLANTA COM LEVE AMARELECIMENTO NAS EXTREMIDADES DAS FOLHAS, 2 PLANTA APRESENTANDO EM TORNO DE 2 FOLHAS NECROSADAS, 3 PLANTA APRESENTANDO APENAS UMA FOLHA VERDE, E 4 A PLANTA MORTA.

Foi observada elevada correlação com os tratamentos definidos pela densidade ($r = 0,94$), com a resistência a penetração medida com o penetrômetro (Figura 2.2). A densidade medida com os anéis volumétricos mostrou-se muito bem correlacionada com os tratamentos estabelecidos ($r = 0,99$) (Tabela 2.3).

O maior incremento na severidade da doença no tratamento compactado ($1,3 \text{ Kg.dm}^{-3}$) ocorreu até os 60 dias após a inoculação. Já o tratamento sem compactação não apresentou aumentos na expressão da doença no período avaliado (Figura 2.4). A incidência da fusariose foi de 84,5% no tratamento com maior compactação e na presença de *F. proliferatum*, enquanto que na presença do patógeno mas sem compactar o solo não ocorreu incidência. A relação entre a severidade de *F. solani* f.sp. *pisi* e a compactação de solo também foi verificada por

KRAFT & BOGE (2001) em ervilha. Os mesmos autores também verificaram que a compactação sozinha sem o efeito da doença também foi capaz de provocar a redução no crescimento radicular, fato que também foi verificado nos resultados deste trabalho (Tabela 2.6).

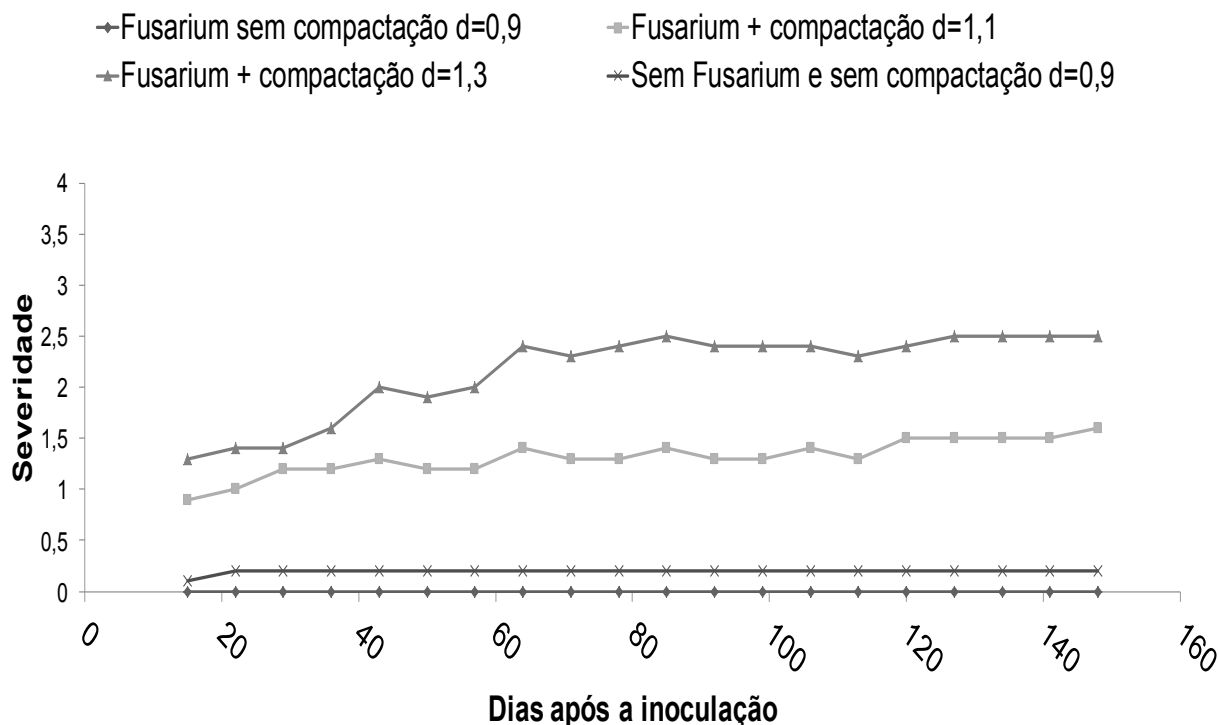
TABELA 2.6 – ALTURA, PESO SECO DE RAÍZES E PESO SECO DE PARTE AÉREA (CAULE E FOLHAS) DE PLANTAS DE PUPUNHEIRA, AOS 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DE *FUSARIUM PROLIFERATUM* SOB TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO.

Tratamentos		Altura (mm)	Peso seco de raízes (g)	Peso seco da parte aérea (caule e folhas (g))
Sem <i>Fusarium</i>	Sem compactação (0,9 Kg. dm ⁻³)	133	1,8	3,9
	1,1Kg. dm ⁻³	106	1,1	3,1
	1,3 Kg.dm ⁻³	94	0,5	2,0
Com <i>Fusarium</i>	Sem compactação (0,9 Kg. dm ⁻³)	151	2,1	5,5
	1,1 Kg.dm ⁻³	105	0,5	2,4
	1,3 Kg.dm ⁻³	94	0,3	1,9

FONTE: O autor (2017).

A análise de componentes principais pela matriz de correlação demonstrou que as variáveis explicam 78,59% da variância acumulada com os componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), e o comportamento das cargas fatoriais demonstra a relação inversa entre a severidade da doença e as variáveis de crescimento da planta (Tabela 2.7). Pode-se observar pelo comportamento dos auto-valores que compactação e a severidade da doença estão apresentando o mesmo sentido, o que indica que a compactação e a severidade da doença variam de forma correlata. Já os auto-valores dos parâmetros de crescimento (Altura, peso seco de raízes e peso seco de caule+folhas) possuem sentido oposto á severidade e compactação, demonstrando o efeito da compactação e da doença também sobre os parâmetros de crescimento da planta (Figura 2.5). Kunhem Júnior et al. (2013) analisando as componentes principais em plântulas de milho inoladas com *Fusarium* spp. observaram que ocorreu redução na emergência de plântulas (57,2 % da variância

explicada), demonstrando assim a aplicabilidade deste tipo de análise para experimentos de inoculação envolvendo diversas variáveis.



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 2.4 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE EM TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DE SOLO (DENSIDADE (D) 0,9, 1,1, E 1,3 kg dm⁻³) AO LONGO DE 150 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO. SEVERIDADE VARIANDO DE 0 (AUSÊNCIA DE SINTOMAS) À 4 (PLANTA MORTA), SENDO 0 A PLANTA SEM SINTOMAS, 1 PLANTA COM LEVE AMARELECIMENTO NAS EXTREMIDADES DAS FOLHAS, 2 PLANTA APRESENTANDO EM TORNO DE 2 FOLHAS NECROSADAS, 3 PLANTA APRESENTANDO APENAS UMA FOLHA VERDE, E 4 PLANTA MORTA.

O tratamento controle sem a presença de *F. proliferatum* também apresentou menor crescimento em função da compactação do solo (Tabela 2.6, Figura 2.6), contudo sem a presença do fungo pode-se observar que a severidade é menor quando comparado as plantas inoculadas demonstrando assim a interação entre a Fusariose e a compactação do solo, e também sobre o crescimento vegetativo da planta. Resultados semelhantes foram observados com *F. solani* f.sp. *pisi* em que o efeito do patógeno somado á compactação do solo foi mais severo do que a

compactação sem a presença do patógeno. Nesse caso quando as plantas foram inoculadas sem a compactação o efeito foi menor sobre o comprimento das raízes do que a compactação sem a presença do patógeno (KRAFT & BOGE, 2001).

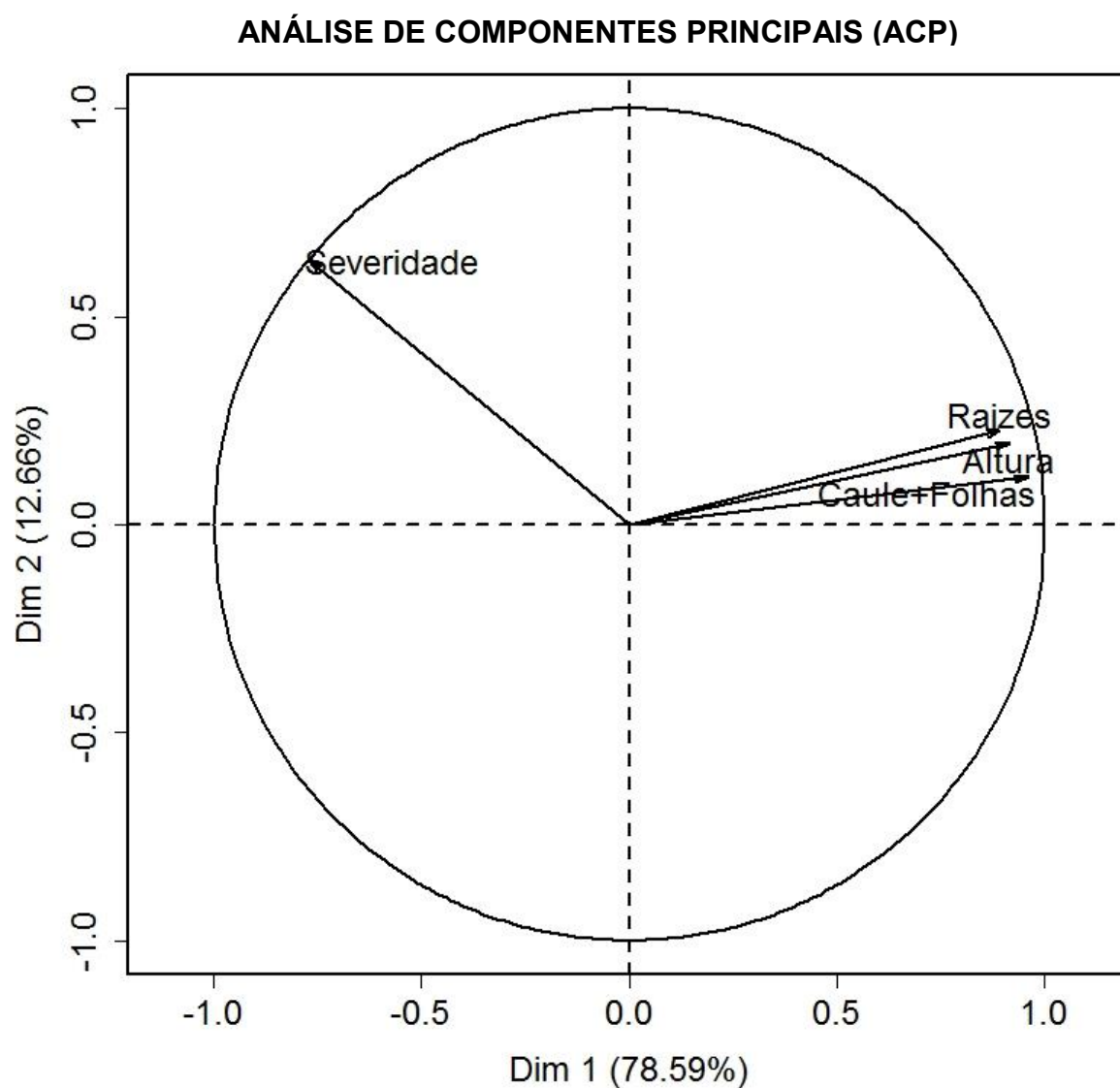
TABELA 2.7 – CARGAS FATORIAIS, AUTO-VALORES E VARIÂNCIA EXPLICADA DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS ALTURA, PESO DE RAÍZES, PESO DE CAULE E FOLHAS, E SEVERIDADE DA FUSARIOSE.

Variáveis	Cargas fatoriais
Altura	0,913
Caule+folhas	0,960
Raízes	0,891
Severidade	-0,771
Autovalor	3,24
Variância explicada (%)	78,59

FONTE: O autor (2017).

PC1 – Componente principal 1; PC2 – Componente principal 2

Nas plantas que se desenvolveram em solo compactado, ocorreu uma redução na altura das plantas comparado ao solo não compactado de 37,71 %, e 29,6 % respectivamente para o solo infectado com *F. proliferatum* e não infectado. Já para o peso seco de caule e folhas essa redução foi de 65,67% e 48,31%, respectivamente entre solo não infectado e infectado, quando se avalia o efeito da compactação. E no peso seco de raízes essa redução chegou a 87,84% e 73,62%, respectivamente para solo infestado e não infestado com *F. proliferatum* (Figura 2.7). O número de plantas mortas foi de 20% nos tratamentos com maior compactação, enquanto no solo sem compactar não ocorreu mortalidade. Esse resultado é semelhante ao obtido por Burke et al. (1980) que relataram aumento da severidade de *F. solani* f.sp. *phaseoli* causador da podridão radicular do feijoeiro, quando as plantas são submetidas á compactação do solo e a doença se expressa com maior severidade.



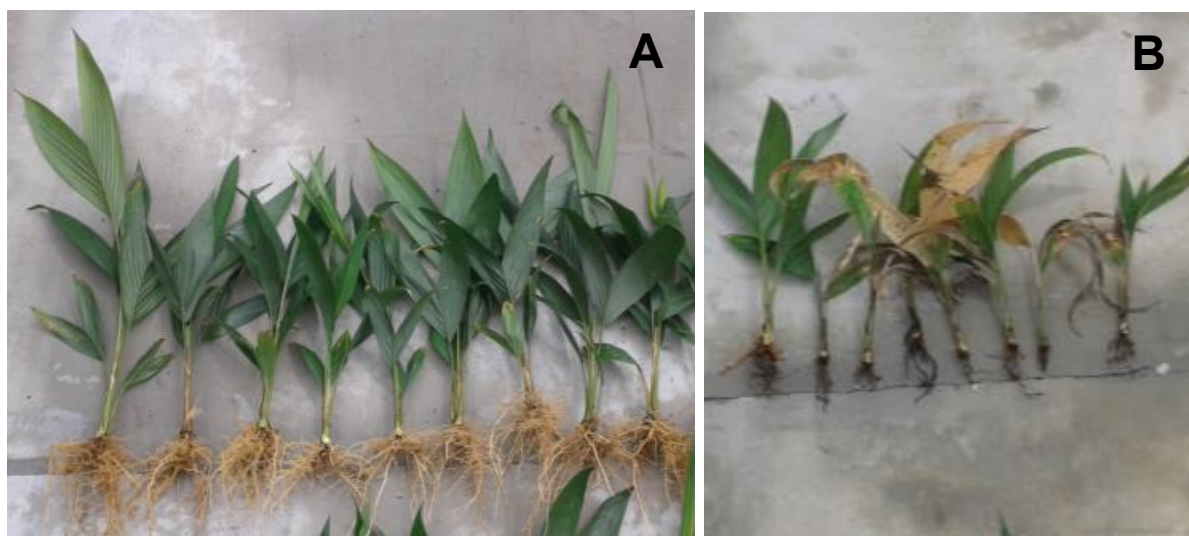
FONTE: O autor (2015).

FIGURA 2.5- ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS PELA MATRIZ DE CORRELAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS ALTURA, PESO SECO DE RAÍZES, PESO SECO TOTAL, SEVERIDADE E COMPACTAÇÃO DO SOLO EM MUDAS EM PUPUNHEIRA.



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 2.6 – SEVERIDADE DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA EM TRÊS NÍVEIS DE COMPACTAÇÃO DO SOLO COLONIZADO COM *Fusarium proliferatum*: DA ESQUERDA PARA A DIREITA 0,9; 1,1 E 1,3 kg.dm⁻³ RESULTANDO NA REDUÇÃO DO CRESCIMENTO PROVOCADO PELA COMPACTAÇÃO.



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 2.7 – EFEITO DA COMPACTAÇÃO DO SOLO SOBRE O CRESCIMENTO DE RAÍZES DE PUPUNHEIRA NA PRESENÇA DE *Fusarium proliferatum*. A) SEM COMPACTAÇÃO (DENSIDADE DE 0,9 kg.dm⁻³); B) COM COMPACTAÇÃO (DENSIDADE DE 1,3 kg.dm⁻³).

2.4 CONCLUSÕES

A compactação do solo somada ao efeito adicional da fusariose aumentou a severidade da doença e a mortalidade de plantas consequentemente.

2.5 REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R.N.T. et al. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* no tomateiro. **Revista Agroambiente**, v. 4, n.1, p. x-y, 2010.
- BURKE, D.W; MILLER, D.E; BARKER, A.W. Effects of soil temperature on growth of beans in relation to soil compaction and *Fusarium* Root Rot. **Phytopathology**, v.70, p.1047-1049. 1980.
- CICHY, K.A; SNAPP, S.S; KIRK, W.W. *Fusarium* root rot incidence and root system architecture in grafted commom bean lines. **Plant Soil**, v.300, p.233-244. 2007.
- CHONG, S.K et al. Mapping soybean sudden death syndrome as related to yield and soil/site properties. **Soil & Tillage Research**, v.84, p.101-107. 2005.
- COSTA JÚNIOR, J.C. da et al. Qualidade Sanitária e Fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. E tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1119-1131. 2016.
- COSTA JÚNIOR, J.C. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pupunheira submetidas a tratamento químico e caracterização dos sintomas da podridão da base do estipe causada por *Fusarium* spp.** 2013. Curitiba: UFPR. 127p (Dissertação Mestrado).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPQ, 1997.
- FOLONI, J.S.S; CALONEGO, J.C; LIMA, S.L. de. Efeito da compactação do solo no desenvolvimento aéreo e radicular de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.947-953, 2003
- GANJI, S; WUBBEN, M.J; JENKINS, J.N. Two simple methods for the collection of individual life stages of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology**, v.45, n.2, p.87-91. 2013.
- GOSSEN, B.D et al. Effect of soil type, organic matter content, bulk density and saturation on clubroot severity and biofungicide efficacy. **Plant Pathology**, v.65, p. 1238-1245. 2016.
- KRAFT, J.M; BOGE, W. Root characteristics in Pea in Relation to compaction and *Fusarium* Root Rot. **Plant Disease**, vol. 85, n.9, p.936-940. 2001.
- KUHNEM JÚNIOR PR et al.. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural** 43, n.4. p.583-588, 2013.
- MEDEIROS, R.D. de; SOARES, A.A; GUIMARÃES, R.M. Efeitos da compactação do solo e do manejo da água sobre os componentes de produção e a produtividade de grãos de arroz. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, n.5, p.960-967. 2005.
- PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

RODRIGUES, P.N.F et al. Crescimento e composição mineral do milho em função da compactação do solo e da aplicação de composto orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.1, p.94-99, 2008.

SANTOS, A.F. et al. Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2008.

SANTOS, A.F.; MACIEL, C.M.G.; FOWLER, J.A.P. Detecção de fitopatógenos em sementes de pupunheira e transmissão de *Fusarium* sp. para plântulas. **Comunicado técnico 277, Colombo**, Embrapa Florestas, 2011.

SILVA, R.H. da; ROSOLEM, C.A. Crescimento radicular da soja em razão da sucessão de cultivos e da compactação do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.855-860, 2002.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

SOUZA, M.A.S et al. Acúmulo de macronutrientes na soja influenciado pelo cultivo prévio do capim-marandu, correção e compactação do solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.611-622. 2012.

WILKE, A.L. et al. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v.91, p.1109-1115, 2007. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-9-1109>>. Acesso em: 17 set. 2017. doi: 10.1094/PDIS-91-9-1109

CAPÍTULO 3 - PATOGENICIDADE DE *Fusarium proliferatum*, *F. chlamydosporum* E *F. oxysporum*, ENDOFÍTICOS À PUPUNHEIRA

RESUMO

A presença de *Fusarium proliferatum* em pupunheira na forma endofítica é pouco conhecida. Pouco se sabe sobre sua patogenicidade, frequência de ocorrência e local onde está presente. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a relação endofítica de *Fusarium* spp. bem como sua patogenicidade. Isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos de plantas sadias de pupunheira provenientes de dois locais de origem. De todos os isolados obtidos 7,8% foram de *Fusarium* spp. os quais foram testados quanto á patogenicidade em pupunheira. Os sintomas começaram a aparecer aos setes dias após a inoculação e foram avaliados semanalmente até 30 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Após o período avaliado foi realizado o reisolamento do patógeno nos meios de cultura Ágar-água (AA) e Batata-dextrose-ágar (BDA), o que confirmou a patogenicidade de *F. proliferatum*, *F. chlamydosporum* e *Fusarium* sp. presente na forma endofítica, mas não de Complexo de espécies *F. oxysporum*. As espécies endofíticas *Fusarium proliferatum*, *F. chlamydosporum* e *Fusarium* sp. são patogênicas à pupunheira.

Palavras-chave: Patógeno latente. Fusariose. *Bactris gasipaes*.

CHAPTER 3 – PATHOGENICITY OF *Fusarium proliferatum*, *F. Chlamydosporum* AND *F. oxysporum*, PEACH PALM ENDOPHYTES

ABSTRACT

The presence of *Fusarium proliferatum* in peach palm in the endophytic form is little known. Little is known about its pathogenicity and frequency of occurrence and location where it is present. The objective of this work was to isolate, characterize and evaluate the endophytic relationship of *Fusarium* spp. as well as its pathogenicity. Isolated from *Fusarium* spp. were obtained from healthy peach palm

trees from two sites of origin. Among all isolates, 7,8% were *Fusarium* spp. which were tested for pathogenicity in peach palm. Symptoms began to appear on the seventh day after inoculation and were evaluated weekly up to 30 days after the onset of the first symptoms. After the evaluated period, the reisolation of the pathogen was carried out in the culture media Agar-water (AA) and Potato-dextrose-agar (PDA), which confirmed the pathogenicity of *F. proliferatum* and *F. chlamydosporum* present in the endophytic form, but wasn't to it *F. oxysporum* species complex. The endophytic species *F. proliferatum* and *F. chlamydosporum* are pathogenic to peach palm.

Key-words: Latent pathogen. Fusariosis. *Bactris gasipaes*

3.1 INTRODUÇÃO

A cultura da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) está presente em vários estados brasileiros, Bahia, Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina. Estes estados se destacam como os maiores produtores nacionais (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). No Paraná houve uma evolução da área plantada de 308 hectares em 2008 (SANTOS et al., 2008) para cerca de 1650 ha em 2017 (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2017). A comercialização do palmito representava cerca de 350 milhões de reais anualmente em todo o mundo, sendo que apenas no estado do Paraná representou 5,4 milhões de reais no ano de 2010 (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014).

A pupunheira possibilita cortes sucessivos, podendo ser manejada para corte de hastes por períodos que chegam até 20 anos, uma vez que a planta apresenta perfilhamento. A oxidação é lenta após o corte, e, essa última característica possibilita a comercialização do palmito *in natura* (SANTOS et al., 2008; PENTEADO JÚNIOR et al., 2014).

A fusariose, doença que resulta na morte das plantas foi descrita pela primeira vez em 1998 (PIZZINATO et al., 1998) no estado de São Paulo, sendo identificadas cinco espécies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme*). ALVES & SANTOS (2006) também demonstraram a patogenicidade de 15 isolados de *Fusarium* spp. A caracterização das espécies de

Fusarium que estão associadas à pupunheira foi descrita por SOUZA (2014), sendo *F. proliferatum* a espécie mais frequentemente associada ao patossistema, sendo encontrada também as espécies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme* (SOUZA, 2014; PIZZINATO et al., 2001, ALMEIDA et al., 2005)

Nos últimos anos, tem-se verificado a associação endofítica de fungos nas plantas de pinhão manso, manga, brassicas, banana e diversas palmeiras (ALMEIDA et al., 2005; PHOTITA et al., 2004; PLOCH & THINES, 2011; RIASCOS-ORTIZ et al., 2011; KUMAR & KAUSHIK, 2013; VIEIRA et al., 2014). Os fungos endofíticos são caracterizados como aqueles capazes de colonizar tecidos vivos de plantas saudáveis, e/ou permanecerem em uma fase dormente ou não causarem sintomas em plantas (PETRINI, 1991) sendo relatados patógenos com diferentes tipos de expressão dos sintomas pelo hospedeiro (DELAYE 2013; VIEIRA et al., 2014).

Em algumas situações, como a que ocorre com *F. foetens* em Begônia, a presença do fungo na forma endofítica pode ajudar a dispersar mais facilmente o patógeno (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Em pupunheira já foi relatada a patogenicidade *in vitro* de *F. proliferatum* e *F. oxysporum* presentes na forma endofítica, em plantas micropropagadas em meio de cultura (ALMEIDA et al., 2005). Contudo, não existem estudos em plantas em condições de casa de vegetação.

O objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a patogenicidade das espécies endofíticas à pupunheira *F. proliferatum*, *F. chlamydosporum* e *F. oxysporum* e caracterizar visando a sua identificação específica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Origem dos isolados e isolamento

Os isolados foram obtidos de mudas de pupunheira saudáveis oriundas de dois viveiros comerciais, em Garuva-SC e em Eldorado-SP, sendo que o material genético possuía duas origens distintas Yurimáguas (Peru) e Rondônia (Brasil-RECA), respectivamente. As plantas adquiridas com 4 meses de idade, foram mantidas em casa de vegetação, no próprio vaso do viveiro.

As plantas foram retiradas do substrato e lavadas em água de torneira até a retirada completa do substrato aderido as raízes. Em seguida, foram divididas em três partes: raiz, folhas e ápice do estipe. Foram retirados fragmentos de cada parte da planta e realizada a desinfestação da seguinte maneira: Etanol 70% por um minuto, Hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, Etanol 95% por 30 segundos. Em seguida os fragmentos foram secos em papel esterilizado e introduzidos no meio de cultura (PHOTITA et al., 2004). Para isolamento foram usados dois meios de cultura batata-dextrose-água (BDA) e ágar-água 2% (AA). Em seguida procedeu-se a incubação a 24° C no escuro, por sete dias. A avaliação consistiu na observação do aparecimento de colônias fúngicas, por um período de até 30 dias.

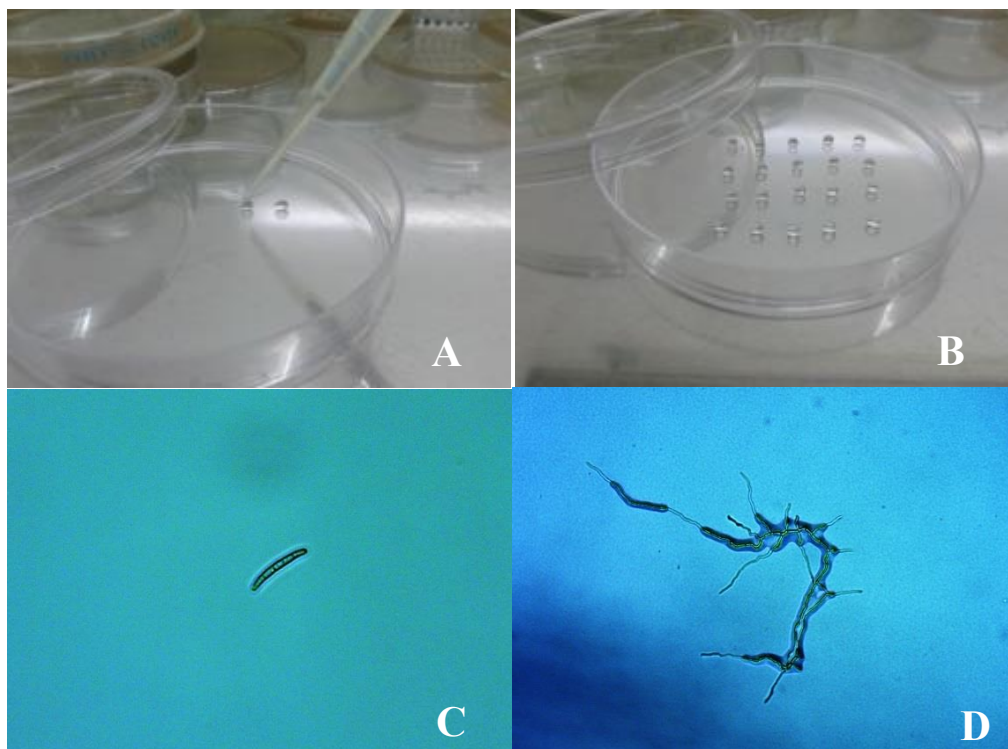
3.2.2 Identificação de *Fusarium*

3.2.2.1 Obtenção de culturas monospóricas

Para a caracterização dos isolados foram obtidas culturas monospóricas dos isolados cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por 10 dias em BOD a 24° C com fotoperíodo de 12h.

Um disco de 5 mm de diâmetro de meio sólido com micélio e esporos foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água ultrapura esterilizada (AE). Procedeu-se agitação manual e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} . A agitação manual dos tubos evita a fragmentação de hifas na suspensão, em relação à agitação em agitador tipo vortex. Em seguida, pipetou-se 20 microgotas de 5 μ L por diluição, sendo as mesmas depositadas em uma placa de petri de poliestireno descartáveis (PPD). O mesmo procedimento foi realizado para cada uma das diluições e, após a pipetagem, as placas foram invertidas e deixadas em repouso por 60 minutos. Posteriormente, o número de esporos em cada microgota foi observado em microscópio de luz com aumento de 100x.

Devido a tensão superficial existente entre a AE e as PPD, as microgotas mantêm-se isoladas e não escorrem (Figura 3.1). Após um período de 60 minutos quando os esporos sedimentaram para a ponta da gota, os mesmos foram visualizados em microscópio de luz com aumento de 100x. Assim que foram identificadas microgotas contendo apenas um esporo as mesmas foram pipetadas para placas de Petri com meio sólido (BDA), em pontos previamente marcados externamente ao vidro da placa.



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 3.1: MICROPIPETAGEM EM PPD (PLACAS DE POLIESTIRENO DESCARTÁVEIS) (A); MICROGOTAS DE SOLUÇÃO COM ESPOROS MANTIDAS ISOLADAS EM PPD (B); ESPORO APÓS SEDIMENTAÇÃO EM MICROGOTA VISUALIZADO EM MICROSCÓPIO (OBJETIVA 10X) (C); INÍCIO DA FORMAÇÃO DA COLÔNIA EM MEIO BDA A PARTIR DE UM ESPORO (OBJETIVA DE 10X) (D).

Após 24 horas e da confirmação de apenas um esporo, a microgota foi pipetada para o meio BDA através de microscopia, quando mais de um esporo era pipetado para o meio de cultura a colônia era descartada.

3.2.2.2 Caracterização morfológica

Para caracterização da produção de clamidósporos pelos isolados de *Fusarium* spp., após o crescimento do patógeno em temperatura de 24° C no escuro em meio Solo-Ágar (SA) adaptado (150 g.L⁻¹ de solo, 20 g.L⁻¹ de ágar), foi avaliada a presença deste marcador através da observação de estruturas por microscopia de luz (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Para a caracterização da produção de cadeias de microconídios os isolados foram cultivados em meio Cloreto de potássio - ágar (KCl 0,6%, Ágar 2%) e as cadeias foram observadas em microscopia diretamente com as placas abertas com aumento de 100X (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Para caracterização da produção das mono e polifialides foram montadas lâminas e observadas em microscopia de luz com aumento de 100x. O cultivo dos isolados para avaliar esta característica foi em meio Sólo-ágar (SA) com a composição de 150 g.L⁻¹ de solo peneirado (peneira de 1 mm) e 20 g.L⁻¹ de ágar (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

A caracterização da produção de esporodóquio foi observada em meio folha de cravo-ágar (FCA) através da observação em microscópio estereoscópico. A composição do meio FCA usada foi 20 g.L⁻¹ de ágar e 5 fragmentos de 5 mm de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) por placa de *petri* (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

3.2.2.3 Caracterização molecular

A identificação molecular foi realizada com a amplificação da região gênica fator de alongação, utilizando os primers TEF1 (5'ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e TEF2 (5'GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'), seguida do sequenciamento (sequenciador 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)). As sequências foram comparadas através do blast search na base de dados Fusarium-ID, buscando-se aquelas com maior identidade (Consulta realizada em 30 de novembro de 2017).

3.2.3 Teste de patogenicidade

Para o teste de patogenicidade foram utilizados 22 isolados de *Fusarium* spp., armazenados em de placas de petri com 15 dias de crescimento em meio BDA, a 24°C, no escuro. Foram adicionados 10 mL de água ultrapura por placa e realizada a raspagem do micélio com o auxílio de uma alça. Posteriormente a solução foi calibrada em hemacitômetro para uma concentração de 1x10⁶ conídios.mL⁻¹.

O teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. foi realizada duas vezes, nos anos de 2015 e 2016. Nos dois experimentos foi incluído o isolado SP-3 de *F. proliferatum* como padrão. Esse método foi previamente aferido com um isolado conhecidamente patogênico em pupunheira (SP-3). O reisolamento do patógeno para aferição do método foi realizado previamente, confirmando a presença do patógeno em meio de cultura. A espécie foi confirmada por meio do sequenciamento da região fator de alongação 1- α .

A solução de conídios foi injetada na parte de baixo da folha com uma seringa de 1 mL (diâmetro de 0,4 mm) de ponta fina na parte de baixo das folhas de pupunheira de mudas com 90 dias de idade (Figura 3.2), em quatro pontos por folha bífida, totalizando 24 repetições por isolado. Para cada isolado foram utilizadas três plantas, contendo cada planta 8 repetições. A presença de sintomas nas folhas foi observada aos sete, 14, 21 e 28 dias (Figura 3.3).



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 3.2 – REGIÃO ENCHARCADA ONDE OCORREU A INJEÇÃO DE SUSPENSÃO DE CONÍDIOS NO MESÓFILO EM FOLHAS DE PUPUNHEIRA PARA TESTE DE PATOGENICIDADE.

3.2.4 Reisolamento do patógeno

O reisolamento do patógeno ocorreu 50 dias após a inoculação e para isso foram utilizadas as folhas com maior severidade. Foi retirado um fragmento de cada lesão da folha totalizando quatro fragmentos por planta. O protocolo de desinfestação foi etanol 95% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por um minuto.

As placas de meio SNA foram incubadas a 24°C no escuro e avaliadas aos sete dias após o reisolamento através da observação de estruturas do patógeno em microscópio de luz (aumento de 100x).

3.2.5 Análise dos dados, condições de condução e avaliação dos experimentos.

A análise de variância dos dados foi realizada em planilha eletrônica do excel, considerando o valor de $p=0,05$. O experimento do ano de 2016 conteve 22 tratamentos com 24 repetições por isolado, sendo que cada planta continha 8 repetições, 4 em cada folha bífida. O experimento de 2015 conteve 5 tratamentos com 12 repetições sendo que cada planta continha 4 repetições. O delineamento foi inteiramente casualizado.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no período entre outubro e dezembro de 2015 e 2016. A rega das plantas, mantidas nos vasos com substrato, foi monitorada diariamente e, quando necessário, regadas com mangueira.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 306 colônias de fungos endofíticos, das quais 7,8% eram de *Fusarium* spp. Além deste fungo, foram encontrados os seguintes gêneros: *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Gliocladium* sp., *Phomopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Thielaviopsis* sp. Alguns destes fungos, como *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp. e *Thielaviopsis* sp. já foram reportados como fitopatogênicos em pupunheira (PIZZINATO et al., 2001; BELLETINI, 2010; ALVES & FLORES, 1982).

Na literatura, existem vários trabalhos relatando a presença de fungos endofíticos em plantas (RODRIGUES, et al., 1990; PETRINI, 1991; RIASCOS-ORTIZ et al., 2011; FRÖHLICH, 2000). No entanto, poucos demonstram o seu potencial como patógeno latente (VIEIRA et al., 2014; PHOTITA et al., 2004). Em pupunheira, apenas um trabalho descreve esse tipo de relação do gênero *Fusarium*, porém, o mesmo foi realizado em condições de cultura de tecidos e propagação vegetativa (ALMEIDA et al., 2005).

Do total de isolados obtidos, 7,8% foram de *Fusarium* sp. indicando que este fungo encontra-se na forma endofítica em pupunheira, como já foi relatado por ALMEIDA et al. (2005) em explantes. Destes tivemos 75% isolados do ápice do estipe, indicando ser este o local de maior colonização interna do hospedeiro. Ainda

nestes mesmos isolados 8,3%, foram de folhas, e 16,7% de raízes. A frequência com que *Fusarium* spp. foram isolados de pupunheira constituiu cerca de 60 % das plantas analisadas para o material originário de Yurimáguas e de 20 a 50% para o material originário do RECA, desconhecendo-se se há alguma relação com a origem do material genético.



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 3.3 – SINTOMAS DE *Fusarium proliferatum* EM FOLHAS DE PUPUNHEIRA. A) SETE DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, B) 14 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, C) 21 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, D) 28 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.

Os isolados endofíticos de *F. proliferatum*, *Fusarium* sp. e do complexo de espécies *F. chlamydosporum* (FCSC) foram patogênicos à pupunheira, apresentando lesões circulares com halo necrótico (Figura 3.3). Os isolados das espécies, Complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) (End 28, End 31), *Fusarium* spp. (End 13) e *Fusarium proliferatum* (End 7, End 10, End 12, End 15, End 21, End 32) não apresentaram patogenicidade (Tabela 3.1 e Tabela 3.3). A

patogenicidade de *Fusarium proliferatum*, FCSC e *Fusarium* sp. endofítico foi confirmada pelo reisolamento de nove isolados. Resultado semelhante já foi observado para plantas micropropagadas em meio de cultura (ALMEIDA et al., 2005).

A presença de patógenos endofíticos, e sua ação na planta causando doença muitas vezes pode ser reflexo de uma condição fisiológica de estresse da planta, levando autores a associá-lo como patógenos fracos (BRADER et al., 2017). Infecções quiescentes ou latentes de fungos já são conhecidas desde 1974, (VERHOEFF, 1974) no entanto há poucas informações sobre o seu modo de ação.

De acordo com Vieira et al. (2014), espécies de *Colletotrichum* patogênicas em manga são conhecidas por possuírem no seu ciclo de relação patógeno - hospedeiro fase de infecção latente até o florescimento e frutificação. Ainda de acordo com estes autores, a expressão de sintomas só ocorre na fase de pós-colheita, em função de alterações fisiológicas do hospedeiro. Essa relação entre endofitismo e patogenicidade foi melhor explicada por Demers et al. (2015), que trabalhou com 295 isolados endofíticos de *F. oxysporum* encontrados em todas as 32 plantas de tomate amostradas. Estes autores suportam a hipótese de que muitos, se não todos, os isolados de *F. oxysporum* são capazes de viver como endófitos, e isso representa uma fonte de diversidade desconhecida. Em pupunheira, não se sabe exatamente o modo de ação das espécies de *Fusarium* encontradas endofiticamente.

Os isolados identificados como *F. proliferatum* (End 2; End 6; End 7; End 8; End 9; End 10; End 12; End 14; End 15; End 17; End 18; End 21; End 23; End 24) (Tabela 3.2) apresentaram características morfológicas de cadeias médias a longas de microconídios, mono e polifiálides, clamidósporos ausentes, falsas cabeças (Tabela 3.2), esporodóquio laranja com macroconídios de 3 a 5 septos sem curvatura significativa.

Os isolados End 19; End 28 e End 31 identificados como *F. oxysporum* (Tabela 3.2) apresentaram características morfológicas de presença de clamidósporos e falsas cabeças em curtas monofiálides (Tabela 3.2). Quando apresentaram esporodóquio estes mostraram-se levemente laranja com macroconídios de 3 septos levemente curvados (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

TABELA 3.1 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ENDOFÍTICOS À PUPUNHEIRA.

Espécie	Isolado	Patogenicidade
<i>F. proliferatum</i>	SP-3	+
	End 06	+
	End 07	-
	End 08	+
	End 09	+
	End 10	-
	End 12	-
	End 14	+
	End 15	-
	End 17	+
	End 21	-
	End 23	+
	End 24	+
	End 32	-
FOSC	End 28	-
	End 31	-
FCSC	End 20	+
<i>Fusarium</i> sp.	End 11	+
	End 13	-
	End 30	+

FONTE: O autor (2017).

(+) Patogênico; (-) Não patogênico.

FOSC: Complexo de espécies *Fusarium oxysporum*; FCSC: Complexo de espécies *F. Chlamydosporum*.

TABELA 3.2 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

Espécie	Isolado	Crescimento BDA 72 h (cm)	Clamidósporos	Cadeias de microconídios	Falsas cabeças	Macroconídios	Microconídios	Fiálides
<i>F. proliferatum</i>	End 2	3,2	-	+	+	+	+	Mono e poli
	End 6	3,0	-	+	+	+	+	Mono e poli
	End 7	2,8	-	+	+	-	+	Mono
	End 8	3,2	-	+	+	+	+	Mono
	End 9	2,8	-	+	+	-	+	Mono
	End 10	2,8	-	+	+	-	+	Poli
	End 12	*	-	+	-	+	+	Mono e poli
	End 14	2,6	-	+	-	-	+	Mono
	End 15	2,7	+	+	+	+	+	Mono e poli
	End 17	3,1	+	+	+	+	+	Mono e poli
	End 18	3,5	-	+	+	+	+	Poli
	End 21	2,3	-	+	-	+	+	Mono
	End 23	2,7	+	+	-	+	+	Poli
	End 24	*	-	+	+	+	+	Mono
	End 32	2,9	-	-	+	-	+	Mono
FOSC	End 19	*	+	-	+	-	+	Mono
	End 31	3,6	+	-	+	+	+	Mono
	End 28	3,4	+	+	+	-	+	Mono
FCSC	End 1	1,3	-	-	+	-	+	Mono
	End 20	1,3	-	-	+	-	+	Mono
<i>Fusarium</i> sp.	End 11	2,4	-	-	+	+	+	Mono
	End 13	2,4	-	-	+	-	+	Mono
	End 30	0,9	-	-	+	-	+	Mono e poli

FONTE: O autor (2017).

(+) Presente; (-) Não observado; *Não avaliado.

Os isolados identificados como *F. chlamydosporum* (End 1; End 20) apresentaram características morfológicas de produzirem clamidósporos rapidamente, cadeias ausentes, e polifiálides características da espécie (Tabela 3.2). Macroconídios de 3 a 5 septos estão presentes mas, não são produzidos em esporodóquio.

A diferença entre fungo endofítico e patógeno latente ainda não está claramente definida na literatura (PHOTITA et al., 2004), mas alguns fungos como *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. isolados regularmente como endófitos de pupunheira são também fitopatogênicos (ALMEIDA et al., 2005).

TABELA 3.3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

Isolado	Espécie	Identidade (%)
End 1	FCSC	94,7
End 2	<i>F. proliferatum</i>	99,1
End 6	<i>F. proliferatum</i>	99,1
End 7	<i>F. proliferatum</i>	98,3
End 8	<i>F. proliferatum</i>	97,5
End 9	<i>F. proliferatum</i>	98,8
End 10	<i>F. proliferatum</i>	97,4
End 12	<i>F. proliferatum</i>	97,7
End 14	<i>F. proliferatum</i>	99,0
End 15	<i>F. proliferatum</i>	99,0
End 17	<i>F. proliferatum</i>	98,8
End 18	<i>F. proliferatum</i>	99,1
End 19	FOSC	99,8
End 20	FCSC	92,4
End 21	<i>F. proliferatum</i>	90,6
End 23	<i>F. proliferatum</i>	98,7
End 24	<i>F. proliferatum</i>	99,1
End 28	FOSC	99,5
End 31	FOSC	100

FONTE: O autor (2017).

A presença de *F. proliferatum* numa forma latente em pupunheira, pode ocorrer por longo período, durante o qual o modo de vida do patógeno é incapaz de alterar a fisiologia do hospedeiro ou causar sintomas. No entanto, em determinado momento, principalmente influenciado por condições de estresse como excesso de umidade ou deficiência nutricional esse modo de vida do fungo dentro do hospedeiro pode mudar, ocasionando então a doença, como já foi observado em banana e manga (PHOTITA et al., 2004; VIEIRA et al., 2014)

A forma endofítica constitui uma importante fase no ciclo de vida de alguns fungos (BRADER, et al., 2017). A disseminação por material de propagação, por exemplo, sem que ocorram medidas preventivas é uma das implicações desse modo de infecção. Desta forma, os fungos endofíticos podem possuir uma importante função no processo de fitopatogenicidade de algumas espécies, dependendo apenas de alterações nas condições ambientais para sua manifestação (BRADER, et al., 2017).

Endofitismo pode compreender parte do ciclo de vida de muitos patógenos podendo ser uma estratégia de sobrevivência. Alterações na fisiologia do hospedeiro ou do fungo, bem como alterações ambientais levando a planta ao estresse podem mudar essa relação assintomática levando ao aparecimento da doença (PHOTITA et al., 2004). Em brassicas existe naturalmente cerca de 5 á 27% de infecção natural das sílaquas por *Albugo*, as quais raramente expressam a incidência da doença (PLOCH & THINES, 2011).

F. proliferatum também é uma espécie relatada como endófito em trigo, reduzindo a capacidade de defesa desse hospedeiro na sua presença (LESLIE & SUMMERELL, 2006), e também em pinhão manso (KUMAR & KAUSHIK, 2013). Considerando a possibilidade de que espécies de *Fusarium* podem ficar latentes na forma endófito e mesmo assim ser patogênicos, como é o caso de *F. verticillioides* em milho (LESLIE & SUMMERELL, 2006), a relação entre *F. proliferatum* e a pupunheira pode ser uma relação semelhante a esta já descrita.

3.4 CONCLUSÕES

As espécies endofíticas isoladas foram *Fusarium proliferatum*, *Fusarium* sp., complexo de espécies *F. oxysporum* e complexo de espécies *F. chlamydosporum*.

As espécies *Fusarium proliferatum*, *Fusarium* sp. e complexo de espécies *F. chlamydosporum* são patogênicas à pupunheira.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.V. de et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40, n.5, p.467-470, 2005.
- ALVES, S.A.R. et al. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a Podridão do Estipe da Pupunheira no Paraná. **Boletim Pesquisa Florestal**, v.52, p.133-140, 2006.
- BELLETTINI, S. **Epidemiologia e manejo da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) da pupunheira**. 2010, 85 f. Tese - Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá
- BRADER, G. et al. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annual Review Phytopathology**, 55, p.61-83, 2017.
- DELAYE, L; GARCIA-GUZMÁN, G; HEIL, M. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens – are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal diversity**, 60, p.125-135, 2013.
- DEMERS, J.E; GUGINO, B.K; JÍMENEZ-GASCO, M.D.M. Hyghly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field grown tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n.1, p. 81-90,,2015.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo de pupunha redesenha a agricultura no litoral do Paraná. Notícias, 14 de março de 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20828921/cultivo-de-pupunha-redesenha-a-agricultura-do-litoral-do-parana>> acessado em 19 de novembro de 2017.
- FRÖHLICH, J; HYDE, K.D; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, 104 (10), p. 1202-1212. 2000.
- KUMAR, S; KAUSHIK, N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. **Plos One**, v. 8, n.2, 2013.
- LESLIE, J; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory Manual**. USA: Iowa, 2006.
- PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial Ecology of Leaves** (eds. J.H.Andrews and S.S. Hirano). Springe-Verlag, New York, USA: p.179-197 1991
- PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa* acuminate latent pathogens? **Fungal diversity**, v. 16, p. 131-140, 2004. Available from: < <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/16-4.pdf> > Acessed: Mar. 15, 2017.
- PIZZINATO, M.A et al. Patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* à plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, suplem., p 272, 1998.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

PLOCH, S; THINES, M. Obligate biotrophic pathogens of the genus *Albugo* are widespread as asymptomatic endophytes in natural populations of Brassicaceae. **Molecular Ecology**, v. 20, p.3692-3699, 2011.

RIASCOS-ORTIZ, D; et al. Reconocimiento de hongos com potencial benéfico associados a la rizosfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K) em la region Pacífico del Valle de Cauca, Colombia. **Acta agrônômica**, 60 (4), p.319-327. 2011.

RODRIGUES, K.F; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi a tropical palm. **Mycological research**, v. 94 (6), p.827-830. 1990.

SANTOS, A.F. et al. Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2008.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

VIEIRA, W.A.S; MICHEREFF, S.J; MORAIS JÚNIOR, M.A; HYDE, K.D; CÂMARA, M.P.S. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal diversity**, v. 67, p. 181-202, 2014.

VERHOEFF, J. Latent infections by fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 12, p.99-110. 1974.

CAPÍTULO 4 – IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Fusarium* CAUSADORAS DA FUSARIOSE DA PUPUNHEIRA NO BRASIL

RESUMO

A fusariose da pupunheira é uma doença importante, podendo tornar-se um fator limitante para o cultivo, sendo poucos os estudos sobre a taxonomia de espécies de *Fusarium* nesta cultura. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológica e molecularmente isolados de *Fusarium* da pupunheira visando a sua identificação específica. Foi realizada a caracterização morfológica pelos marcadores clamidósporos, cadeias de microconídios, falsas cabeças, fiálides, velocidade de crescimento, macro e microconídios. Para a caracterização molecular foi sequenciada a região gênica do fator de alongação 1- α e as sequências foram comparadas no banco de dados Fusarium-ID. Para a análise filogenética das sequências foi utilizado o método de Neighbor-Joining, com número de replicações do bootstrap de 500, modelo de Maximum Composite Likelihood e modo de tratamento dos Gaps de completa deleção. As principais espécies de *Fusarium* isoladas na forma epifítica e endofítica em pupunheira foram identificadas como: *F. proliferatum*; complexo de espécies *F. oxysporum*; *F. verticillioides*; complexo de espécies *F. chlamydosporum*; complexo de espécies *F. solani*; complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). A espécie *Fusarium proliferatum* foi predominante no passistema fusariose da pupunheira, apresentando-se na forma endofítica como epifítica.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes* var. *Gasipaes*, Endofitismo, Filogenia, Fusariose, *Fusarium proliferatum*.

CHAPTER 4 – IDENTIFICATION OF *Fusarium* SPECIES, CAUSE OF THE FUSARIOSE OF PEACH PALM IN BRAZIL

ABSTRACT

Peach palm fusariosis is an important disease and can become a limiting factor for cultivation. There are few studies on the taxonomy of *Fusarium* species in peach palm. The objective of this work was to characterize morphologically and molecularly, strains of *Fusarium* in the peach palm tree aiming its specific identification. The morphological characterization was performed by the chlamydospore markers,

microconidia chains, false heads, phialides, growth velocity, macro and microconidia. For the molecular characterization the gene region, elongation factor 1- α was sequenced and the sequences were compared in the Fusarium-ID database. The phylogenetic analysis of the sequences was performed using the MEGA 6 program. The method used was the Neighbor-Joining method, with replicate numbers of the bootstrap of 500, the model used was the Maximum Composite Likelihood and the mode of treatment of the Gaps was the of complete deletion. The main species of *Fusarium* isolated in epiphytic and endophytic form in peach palm were identified as: *F. proliferatum*; *F. oxysporum* species complex; *F. verticillioides*; *F. chlamydosporum* species complex; *F. solani* species complex; and *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). *F. proliferatum* is the predominant species in the fusariosis disease of peach palm, being present both in the endophytic and epiphytic forms.

Key-words: *Fusarium proliferatum*, phylogeny, fusariosis, endophytic, *Bactris gasipaes* (Kunth) var. *gasipaes* (Henderson).

4.1 INTRODUÇÃO

A cultura da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) vem se expandindo nos últimos anos no Brasil, com uma área total que corresponde a cerca de 20.000 hectares (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014). No estado do Paraná a área plantada de 308 hectares em 2008 (SANTOS et al., 2008) aumentou para cerca de 1650 ha em 2017 (EMBRAPA, 2017). Atualmente, a comercialização do palmito representa cerca de 350 milhões de reais anualmente em todo o mundo, sendo que apenas no estado do Paraná representou 5,4 milhões de reais no ano de 2010 (PENTEADO JÚNIOR et al., 2014).

A pupunheira encontra-se plantada em diversos estados do Brasil, sendo que, Bahia, Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Santa Catarina se destacam como os maiores produtores. Além destes podem ser citados ainda Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Tocantins, Rondônia, Acre, Amazonas, e Pará (Santos et al., 2008).

A fusariose, foi descrita pela primeira vez em 1998 (PIZZINATO et al., 1998) no estado de São Paulo, sendo uma doença importante para a pupunheira e podendo tornar-se um fator limitante para o cultivo (COSTA JÚNIOR et al., 2016). Os

sintomas caracterizam-se pelo amarelecimento de folhas chegando a causar a morte das plantas (PIZZINATO et al., 2001). *Fusarium* spp. pode ser transmitido pelas sementes de pupunheira e causar prejuízos na fase de produção de mudas (COSTA JÚNIOR et al., 2016).

Atualmente sabe-se que a fusariose está presente nos estados de Rondônia, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (PIZZINATTO et al., 2001; ALVES et al., 2006; SOUZA, 2014) e, devido à sua transmissão por sementes (COSTA JÚNIOR et al., 2016) possivelmente já esteja disseminada por todo o território nacional.

A fusariose ocorre em outras palmeiras como *Phoenix dactylifera*, *Elaeis guineenses*, *Phoenix canariensis* e *Syagrus romanzoffiana*. As espécies de *Fusarium* normalmente associadas à doença nessas palmeiras são: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis*; *F. oxysporum* f.sp. *canariensis*; *F. oxysporum* f. sp. *palmarum*; *F. oxysporum* var. *redolens*; *F. proliferatum*; *F. equiseti-incarnatum* (DIHAZI et al., 2003; HO et al., 1985; GODSWILL et al., 2015; ELLIOT et al., 2010; PHYLER et al., 2000).

Há poucos estudos sobre a etiologia da fusariose da pupunheira. No entanto a doença tem sido associada a mais de uma espécie de *Fusarium* (PIZZINATTO et al., 2001; SOUZA, 2014) e o primeiro relato em pupunheira não possui descrição das espécies nem mesmo sequenciamento gênico (PIZZINATO et al., 2001). São citadas espécies na literatura caracterizadas como *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. anthophilum*, *F. subglutinans*, e *F. moniliforme* (SOUZA, 2014; PIZZINATO et al., 2001, AIMEIDA et al., 2005). Dentre estas *Fusarium proliferatum* é a espécie mais frequentemente encontrada como demonstrado por Souza (2014) que caracterizou 11 isolados.

Para a caracterização molecular de espécies de *Fusarium* existem cerca de 10 loci que podem ser utilizados, contudo três loci tem sido utilizados mais frequentemente, sendo eles: Fator de alongação 1- α e duas regiões de subunidades de RNA polimerase (RPB-1 e RPB-2). Contudo, o sequenciamento de várias regiões de um mesmo isolado, nem sempre acrescenta informações na identificação dos isolados, resultando na mesma espécie por ambas as regiões (do CARMO, 2017).

As espécies *F. proliferatum*, *F. anthophilum* e *F. subglutinans* pertencem ao complexo *Fusarium fujikuroi* e podem ser morfológicamente confundidas (NYRENBERG & O'DONNELL, 1998). Entre as espécies *F. proliferatum*, *F.*

verticillioides e *F. oxysporum*, embora possam ser confundidas alguns marcadores morfológicos como comprimento da cadeia de microconídios, e a presença de polifíalides podem solucionar dúvidas na identificação (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Os estudos sobre a taxonomia de espécies de *Fusarium* em pupunheira no Brasil (PIZZINATO et al., 2001; SOUZA, 2014), não são conclusivos em relação à espécie predominante nos plantios brasileiros. Além disso, a distribuição das espécies no país não está bem elucidada pois são trabalhos pontuais, com um número reduzido de isolados que não abrange necessariamente este patossistema.

O objetivo deste trabalho foi identificar as espécies de *Fusarium* causadoras da fusariose em pupunheira no Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Origem dos isolados:

Neste trabalho foram utilizados 51 isolados de *Fusarium* spp. da coleção de fungos florestais da Embrapa Florestais, Colombo-PR. Estes isolados foram obtidos de amostras plantadas nas seguintes regiões brasileiras: Santa Catarina (GA-1; GA-3; End 1; End 2; End 17; End 18; End 19; End 20; End 25; End 30; End 31), Paraná (BG-02, BG-11, BG-12, BG-13, BG-15, BG-21, SAF-2, SAF-3, SAF-4, SAF-5, SAF-6, SAF-7, SAF-8, Fus 13, Fus 12, Fus 2), Rondônia (SP-3, SP-5, SP-2, 1A, 1A02E, 3A, 7A), Minas Gerais (BG-14) e São Paulo (CA-1A, CA-1B, CA-2, CA-3; End 6; End 7; End 8; End 9; End 10; End 11; End 12; End 13; End 14; End 15; End 21; End 23; End 24; End 28; End 29; End 31). Destes isolados, 44 % foram oriundos de plantas sadias em isolamentos endofíticos (isolados End 1; End 2; End 6; End 7; End 8; End 9; End 10; End 11; End 12; End 13; End 14; End 15; End 17; End 18; End 19; End 20; End 25; End 21; End 23; End 24; End 28; End 29; End 30; End 31; End 31) e 56% associados a fusariose (demais isolados). Em estudos prévios determinou-se a patogenicidade de todos os isolados de *Fusarium* à pupunheira.

4.2.2 Identificação das espécies de *Fusarium*

4.2.2.1 Caracterização morfológica.

Para a caracterização morfológica utilizou-se como referência o *The Fusarium Laboratory Manual* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Para a avaliação da produção de cadeias de microconídios, os isolados foram cultivados em meio Cloreto de potássio - ágar (KCl 0,6%, Ágar 2%) e as cadeias foram observadas por microscopia de luz diretamente nas placas abertas no aumento de 100X.

Para caracterização da produção das mono e polifíalides foram montadas lâminas a partir do cultivo dos isolados em meio Sólo-ágar adaptado (SA) (150 g.L⁻¹ de solo, 20 g.L⁻¹ de ágar) e observadas em microscopia de luz.

A caracterização da produção de esporodóquio foi observada em meio folha de cravo-ágar (FCA) por meio da observação em lupa (40x). A composição do meio FCA usada foi 20 g.L⁻¹ de ágar e 5 fragmentos de 5 mm de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) por placa de *petri* (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Para visualização da produção de clamidósporos dos isolados de *Fusarium* spp., após o crescimento a 24° C no escuro em meio Solo-Ágar (SA), foi avaliado a presença desta estrutura em microscopia de luz (aumento 400x).

4.2.3 Caracterização molecular.

Para a extração de DNA os isolados foram cultivados em meio extrato de malte 2% (20g.L⁻¹) e incubados a 24° C sob agitação de 100 rpm no escuro. Após o período de incubação foi confirmado se o crescimento micelial era de *Fusarium* pela observação de microconídios em microscópio de luz (aumento 400x). O micélio foi filtrado em gase estéril não aderente (Cicatrisan©) e lavado com piseta em água ultrapura. Foram utilizadas entre 40 mg à 120 mg de micélio por isolado. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e o DNA extraído utilizando se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Após a extração as amostras foram secas à vácuo no aparelho speed vac (10 min a 60° C), então reidratados com 100 µL da solução de reidratação de DNA (Promega). O resultado da extração foi visualizado em gel de agarose 0,8% após a eletroforese a 80 mV por aproximadamente uma hora.

A identificação molecular foi realizada com a amplificação da região gênica fator de alongação, utilizando os primers TEF1 (5'ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e TEF2 (5'GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'), seguida de sequenciamento (sequenciador 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)). As sequências foram

comparadas através do blast search na base de dados Fusarium-ID, buscando se aquelas com maior similaridade. A reação de PCR foi constituída por 34 ciclos de amplificação, sendo composto de desnaturação a 94° C por 30s; anelamento a 58° C por 45s; extensão a 72° C por 1min e seguida de refrigeração por tempo indeterminado. As concentrações dos componentes da reação da PCR são foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo um volume de aproximadamente 2 µL de DNA, tampão 10x, 0,2 µM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer e 0,6 unidades da enzima Taq polimerase.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% preparado com tampão SB 0,5x (BRODY & KERN, 2004) sendo a eletroforese realizada a 200 mV. Os fragmentos amplificados foram visualizados comparando com o marcador de peso molecular de 100pb, para comprimentos de 680 pb

Os fragmentos amplificados foram purificados com acetato de amônio 7,5 mol.L⁻¹, e depois secas no aparelho speed vac 60° C 10 min. As amostras foram reidratadas e quantificadas no aparelho Epock-Biotek, para correção do volume e preparo das amostras para o sequenciamento. Após correção do volume as amostras foram preparadas com o kit Bigdye terminator na concentração de 1 µL para 50 µg de produto de PCR, para um volume final de reação de 10 µL, e cerca de 50 ng de produto da PCR.

A análise filogenética das sequências foi realizada utilizando o programa MEGA 6. Inicialmente as sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustalw. O método de agrupamento utilizado foi o de Neighbor-Joining, com número de replicações do bootstrap de 500, o modelo utilizado foi o de Maximum Composite Likelihood e o modo de tratamento dos Gaps foi o de completa deleção. O outgroup utilizado foi uma sequência de *Graphium carbonarium* (N° de acesso CMW 12420).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados morfológica e molecularmente 51 isolados de *Fusarium* oriundos de cinco regiões brasileiras produtoras de pupunheira. Do total analisado, 47 % dos isolados foram identificados molecularmente como *F. proliferatum*. 20 % destes como pertencentes os complexo de espécies *F. oxysporum*; 14,5 % complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, 2% *F. verticillioides*, 2% complexo de

espécies *F. solani*, e 4% complexo de espécies *F. chlamydosporum*. As análises moleculares complementaram as análises morfológicas.

Os isolados identificados como *F. proliferatum* (SP-3; SP-3HR; SP-5; Fus 2; Fus 12; Fus 13; GA-3; SAF-2; SAF-4; SAF-7; SAF-8; CA-1A; End 2; End 6; End 7; End 8; End 9; End 10; End 12; End 14; End 15; End 17; End 18; End 21; End 23; End 24) apresentaram características morfológicas de cadeias médias a longas de microconídios, falsas cabeças, clamidósporos ausentes, poli e monofiálides, e macroconídios com 3 a 5 septos, ligeiramente curvo quase reto (Tabela 4.2).

Os isolados identificados como *F. oxysporum* (1A; 1A02E; A7; GA-1; BG-11; BG-14; CA-1B; CA-2; End 19; End 28 e End 31) apresentaram características morfológicas de presença de clamidósporos com leve pigmentação, falsas cabeças em monofiálides curtas, ausência de cadeias de microconídios, microconídios de forma oval o obvoide com base truncada, e macroconídios levemente curvados (Tabela 4.2).

Os isolados identificados como *F. chlamydosporum* (End 1; End 20) apresentaram características morfológicas de crescimento lento em meio BDA 25°C no escuro, cadeias ausentes, longas monofiálides, elevado número de falsas cabeças, cadeias de microconídios ausentes, microconídio obvoide e alantoide (Tabela 4.2).

O isolado identificado como *F. verticillioides* (3A) apresentou como marcadores morfológicos: clamidósporos ausentes, longas e abundantes cadeias de microconídios em meio KCl-Ágar e monofiálides (Tabela 4.2).

As espécies encontradas em pupunheira podem ser morfologicamente diferenciadas por marcadores morfológicos como clamidósporos, cadeias de microconídios, falsas cabeças e a presença de polifiálides (Figura 4.3; Figura 4.4).

Todos as espécies amplificaram o fragmento de 680 pb referente a região do fator de elongação 1- α , a qual é representativa para um amplo espectro de espécies de *Fusarium* (PARK et al., 2011), permitindo a diferenciação entre elas. Embora existam cerca de 10 loci capazes de diferenciar as espécies, o sequenciamento das três mais frequentes (Fator de elongação 1- α ; e duas regiões de subunidades de RNA polimerase (RPB-1 e RPB-2)) muitas vezes não acrescentam informação na

identificação das espécies (do CARMO, 2017), podendo ser realizado o sequenciamento de apenas uma região.

O maior número de isolados foi identificado como *F. proliferatum*, com valores de similaridade que variaram de 89,6% até 99,1% (Tabela 4.1). Esta espécie pertence ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* e vários isolados (SAF-3; SAF-5; SAF-6; BG-02; BG-12; BG-15; BG-21; CA-3) apresentaram alta similaridade com este complexo (89,3 a 99,8%).

Alguns isolados foram identificados como complexo de espécies *F. oxysporum* (similaridade de 97,5 á 100%), sendo esta espécie já relatada anteriormente em pupunheira (COSTA JÚNIOR et al., 2016; SOUZA, 2014; ALMEIDA et al., 2005).

Além destas duas espécies, foram identificados, em menor proporção, as espécies dos complexos *F. chlamydosporum* e *F. solani*, e a espécie *F. verticillioides*.

Pela análise filogenética pode-se observar que a árvore obtida apresentou sete clados distintos (Figura 4.1). O primeiro deles agrupa os isolados identificados como *F. proliferatum* e *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), que correspondem a maioria dos isolados. Entretanto, as raízes da árvore não indicam distância filogenética entre isolados endofíticos e associados à fusariose da pupunheira.

O segundo clado identifica o isolado de *F. verticillioides* (3A) com um bootstrap de 96 indicando a correta identificação da espécie que é claramente diferente de *F. proliferatum*.

O clado seguinte é o pertencente ao complexo *F. oxysporum*, e pode-se perceber que há uma ramificação entre os nove isolados desta espécie que ocorreu devido aos diferentes locais de origem dos isolados (Figura 4.2). Um dos clados é representado por três isolados de Rondônia (1A; 1A02E; A7), e dos demais isolados pertencem a outros estados como Minas Gerais (BG-14), Paraná (BG-11), São Paulo (CA-1B; CA-2; End 28 e End 31) e Santa Catarina (End 19).

Logo abaixo o clado do complexo *F. solani* com o isolado BG-13. E a partir deste ocorre uma ramificação dos isolados End 1 e End 20, que apresentaram alta similaridade com *F. chlamydosporum* mas não ficaram no mesmo clado. Outras espécies que também apresentaram similaridade com End 01 e End 20 (*F.*

domesticum; *F. delphinoides*; complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*) não se aproximaram, do ponto de vista evolutivo, distanciando-se da raiz destes isolados.

Na tamareira, uma palmeira muito cultivada no Marrocos para a produção de tâmaras, *F. proliferatum* foi relatado no ano 2000 (Abdalla et al., 2000). Esta espécie está sendo frequentemente relatada associada á palmeiras, contudo em *Syagrus romanzoffiana* (Jerivá), embora ela tenha sido encontrada em palmeiras mortas não apresentou patogenicidade (Elliot et al., 2010). A espécie *F. proliferatum* é a mais representativa da fusariose da pupunheira (Souza, 2014), apresentando maior número de isolados, originados de diferentes regiões do Brasil (Figura 4.2), e patogenicidade confirmada. Esta espécie denominada anteriormente de *Gibberella intermedia* nos últimos anos com o auxílio de ferramentas moleculares, vem ganhando destaque com primeiros relatos em diversos hospedeiros (Bhale et al., 2012; Klokocar-smit et al., 2007; Ravi Sankar et al., 2014; Dugan et al., 2003).

TABELA 4.1 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA.

Isolado	Espécie	Crescimento BDA 72 h (cm)	Clamidoporos	Cadeias de microconídios	Falsas cabeças	Conídios		
						Macro	Micro	Fiálide
SP – 5	<i>F. proliferatum</i>	2,3	-	+	+	-	+	
Fus – 13	<i>F. proliferatum</i>	2,6	-	+	+	-	+	Mono e poli
SP – 3	<i>F. proliferatum</i>	2,3	-	+	+	-	+	Mono e poli
Fus – 12	<i>F. proliferatum</i>	*	-	-	+	+	+	Mono e poli
Fus – 2	<i>F. proliferatum</i>	*	-	+	+	+	+	Mono e poli
1 A	FOSC	*	+	-	+	+	+	Mono
1 A02E	FOSC	*	+	-	+	-	+	
3 A	<i>F. verticillioides</i>	2,7	-	+	-	-	+	Mono
GA – 3	<i>F. proliferatum</i>	*	+	+	+	-	+	Mono e poli
A7	FOSC	*	-	-	+	-	+	
SP – 2	FFSC	3,0	+	-	+	-	+	Mono
GA – 1	FOSC	*	+	-	+	-	+	Mono
BG – 14	FOSC	3,0	+	-	+	-	+	Mono e poli
SAF – 2	<i>F. proliferatum</i>	2,1	-	+	+	-	+	
CA – 1 A	<i>F. proliferatum</i>	*	+	-	+	-	+	Mono
SAF – 3	FFSC	*	-	-	+	-	+	Mono
SAF – 7	<i>F. proliferatum</i>	2,7	-	-	+	-	+	Mono e poli
SAF – 8	<i>F. proliferatum</i>	*	-	+	+	-	+	
SAF – 5	FFSC	2,5	-	-	+	-	+	Mono
CA – 1B	FOSC	*	-	-	+	-	+	
CA – 2	FOSC	*	-	-	+	-	+	Mono e poli
BG – 21	FFSC	2,9	-	+	+	-	+	
BG – 2	FFSC	3,0	-	-	-	-	+	Mono e poli
BG – 11	FOSC	3,0	+	-	+	-	+	Mono
BG – 15	FFSC	2,0	+	-	-	-	-	-
SP-3HR	<i>F. proliferatum</i>	2,5	-	+	-	+	+	Mono
SAF – 4	<i>F. proliferatum</i>	2,9	-	-	+	-	+	Mono
End 1	FCSC	1,3	-	-	+	-	+	Mono
End 2	<i>F. proliferatum</i>	3,2	-	+	+	-	+	Mono e poli
End 6	<i>F. proliferatum</i>	3,0	-	+	+	+	+	Mono e poli
End 7	<i>F. proliferatum</i>	2,8	-	+	+	-	+	Mono
End 8	<i>F. proliferatum</i>	3,2	-	+	+	+	+	Mono
End 9	<i>F. proliferatum</i>	2,8	-	+	+	-	+	Mono
End 10	<i>F. proliferatum</i>	2,8	-	+	+	-	+	Poli
End 11	<i>Fusarium</i> sp.	2,4	-	-	+	+	+	Mono
End 12	<i>F. proliferatum</i>	*	-	+	-	+	+	Mono e poli
End 13	<i>Fusarium</i> sp.	2,4	-	-	+	-	+	Mono
End 14	<i>F. proliferatum</i>	2,6	-	+	-	-	+	
End 15	<i>F. proliferatum</i>	2,7	+	+	+	+	+	Mono e poli
End 17	<i>F. proliferatum</i>	3,1	+	+	+	+	+	Mono e poli
End 18	<i>F. proliferatum</i>	3,5	-	+	+	+	+	Poli
End 19	FOSC	*	+	-	+	-	+	Mono
End 20	FCSC	1,3	-	-	+	-	+	Mono
End 21	<i>F. proliferatum</i>	2,3	-	+	-	+	+	-
End 23	<i>F. proliferatum</i>	2,7	+	+	-	+	+	Poli
End 24	<i>F. proliferatum</i>	*	-	+	+	+	+	Mono
End 25	<i>Fusarium</i> sp.	0,9	-	-	+	-	+	Mono
End 28	FOSC	3,4	+	+	+	-	+	
End 30	<i>Fusarium</i> sp.	0,9	-	-	+	-	+	Mono e poli
End 31	FOSC	3,6	+	-	+	+	+	Mono
End 32	<i>F. proliferatum</i>	2,9	-	-	+	-	+	Mono

FONTE: O autor (2018). (+) Presente; (-) Não observado; *Não avaliado.

TABELA 4.2 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO FATOR DE ELONGAÇÃO 1- α PARA ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA ENDOFÍTICOS E ASSOCIADOS À FUSARIOSE.

Condição	Isolado	Espécie	Número de acesso	Similaridade (%)
Associados a Fusariose	SP – 5	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	98,6
	Fus – 13	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	98,2
	SP – 3	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	98,0
	Fus – 12	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	95,8
	Fus – 2	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	98,4
	1 A	FOSC.	NRRL36389	100
	1 A02E	FOSC	NRRL36389	97,5
	3 A	<i>Fusarium verticillioides</i>	CBS 734.97	99,6
	GA – 3	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL22944	98,5
	A7	FOSC	NRRL 38322	99,5
	SP – 2	FSSC.	NRRL 22783	100
	GA – 1	FOSC	NRRL 26993	99,2
	BG – 14	FOSC	NRRL 25424	99,2
	SAF – 2	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,7
	CA-1 A	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,8
	SAF – 3	FFSC	NRRL 26064	99,8
	SAF – 7	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,4
	SAF – 8	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,6
	SAF – 5	FFSC	NRRL 26064	99,0
	BG – 12	FFSC	NRRL 47473	97,7
	CA – 3	FFSC	NRRL 47473	99,3
	CA – 1B	FOSC	NRRL 26993	99,2
	CA – 2	FOSC	NRRL 22543	98,8
	BG – 21	FFSC	NRRL 47473	99,4
	BG – 2	FFSC	NRRL 47473	99,5
	BG – 11	FOSC	NRRL 28395	99,7
	BG – 15	FFSC	NRRL 46612	89,3
	SAF – 6	FFSC	NRRL 25346	99,8
	SP-3HR	<i>Fusarium proliferatum</i>	CBS 217.76	92,0
	BG – 13	FSSC	NRRL 22779	94,1
	SAF – 4	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,5
Endofíticos	End 1	FCSC	(*)	94,66
	End 2	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	99,1
	End 6	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	99,1
	End 7	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	97,4
	End 8	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	97,5
	End 9	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	99,1
	End 10	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	97,8
	End 12	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	97,0
	End 14	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,5
	End 15	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,4
	End 17	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,4
	End 18	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	99,1
	End 19	FOSC	NRRL 45907	99,8
	End 20	FCSC	La-72016A	91,0
	End 21	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	89,6
	End 23	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	98,7
	End 24	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	99,1
	End 28	FOSC	NRRL 43499	99,3
	End 31	FOSC	NRRL 36472	100
	End 32	<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	95,1

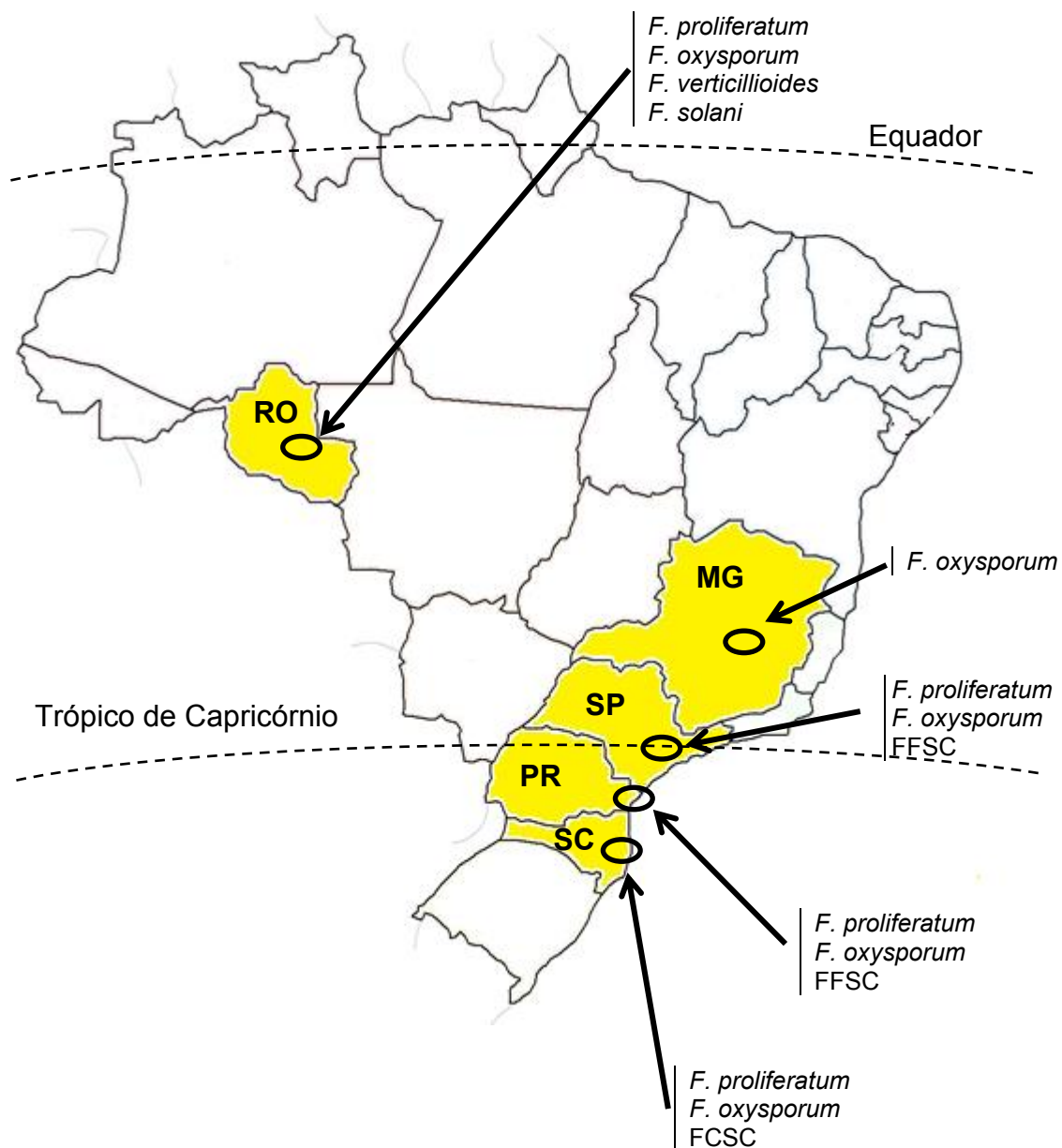
FONTE: O autor (2018).

(*) Não disponível.



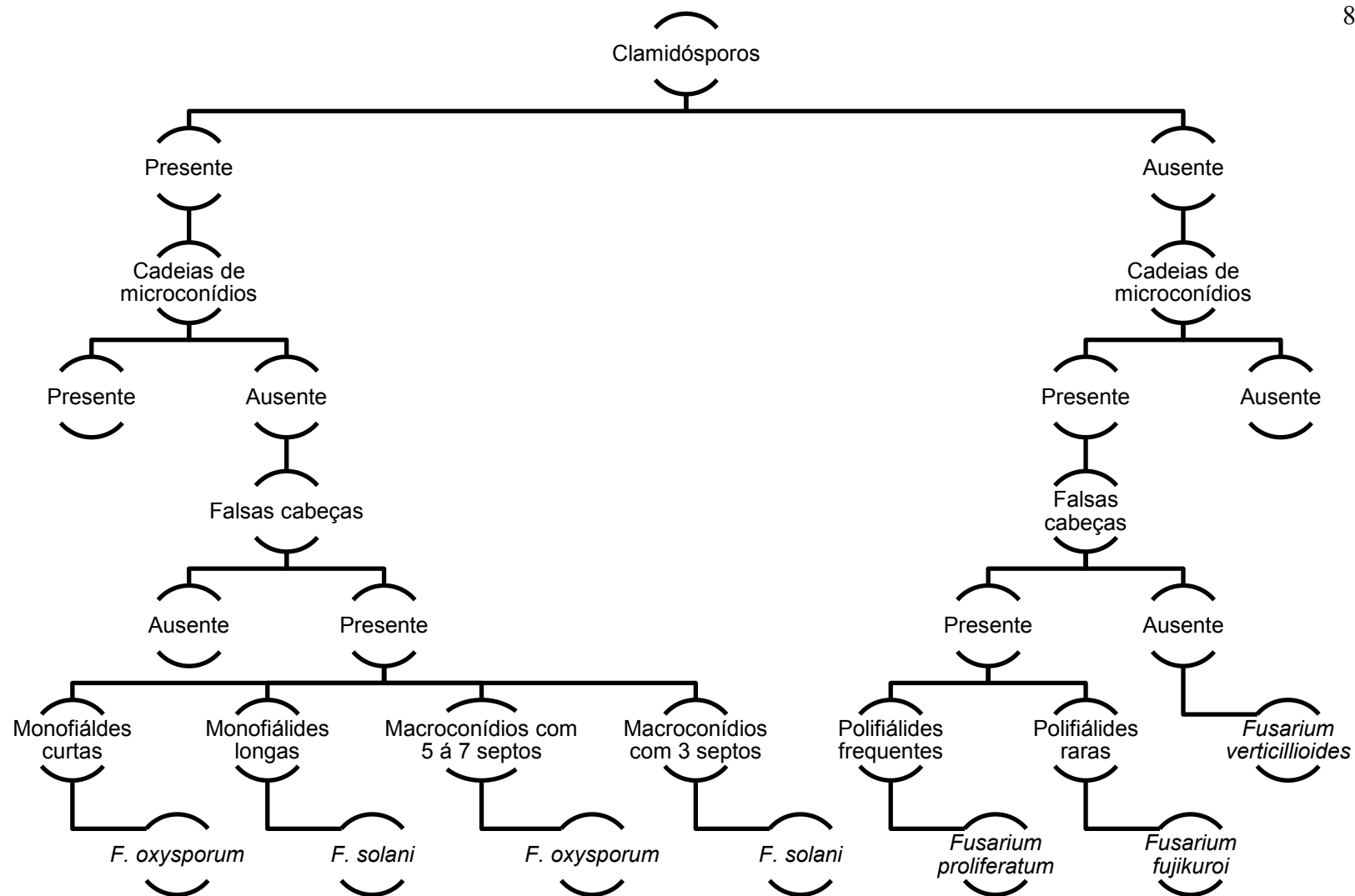
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 4.1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PUPUNHEIRA OBTIDA A PARTIR DA REGIÃO GÊNICA DO FATOR DE ELONGAÇÃO 1- α , UTILIZANDO SE O MÉTODO NEIGHBOR-JOINING.



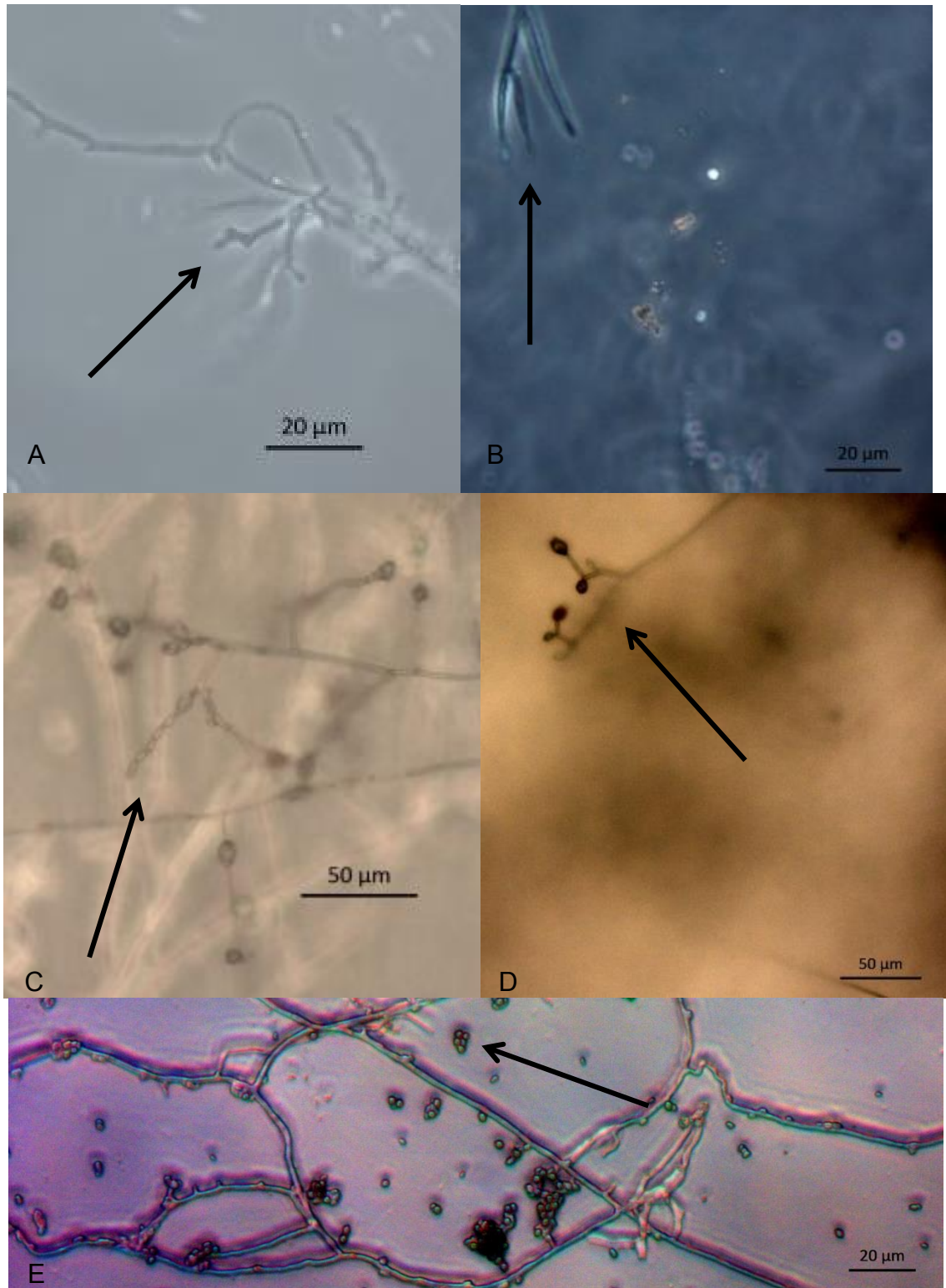
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 4.2 – DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Fusarium* (*F. proliferatum*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. oxysporum* (FOSC), *F. verticillioides*, COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium solani* (FSSC), COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium fujikuroi* (FFSC), COMPLEXO DE ESPÉCIES *F. chlamydosporum* (FCSC)) NAS REGIÕES PRODUTORAS DE PUPUNHEIRA NO BRASIL.



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 4.3 – CHAVE PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Fusarium* DA PUPUNHEIRA NO BRASIL.



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 4.4 – MARCADORES MORFOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Fusarium* EM PUPUNHEIRA. A) POLIFIÁLIDES; B) MONOFIÁLIDES; C) CADEIAS DE MICROCONÍDIOS; D) FALSAS CABEÇAS; E) CLAMIDÓSPOROS.

4.4 CONCLUSÕES

Foram identificadas as seguintes espécies de *Fusarium* na pupunheira: *F. proliferatum*, complexo de espécies *F. oxysporum*, complexo de espécies *F. solani*, *F. verticillioides*, complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, complexo de espécies *F. chlamydosporum*.

Fusarium proliferatum é a espécie predominante nos plantios brasileiros de pupunheira, ocorrendo como endofítico e em associação com a fusariose.

4.5 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M.Y. et al. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from Date Palm in Saudi Arabia. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.321-324, 2000.
- ALMEIDA, C.V. de et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40, n.5, p.467-470, 2005.
- BHALE, U.N., CHATAGE, V.S., AMBUSE, M.G. First report of *Fusarium proliferatum* inciting wilt of *Rumex acetosa* L. in Maharashtra, India. **Plant Pathology and Microbiology**, v. 3, n.1, 2012.
- BRODY, J.R & KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.
- COSTA JÚNIOR, J.C. da et al. Qualidade Sanitária e Fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. E tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1119-1131. 2016.
- DIHAZI, A. et al. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. **Plant Physiol. Biochem**, v.55, p.7-15, 2012.
- Do CARMO, A.L.M. ***Fusarium* em sementes de pinus no Brasil: Distribuição, Patogenicidade, Identificação de espécies e controle biológico**. 2017. 87 flh. Tese-Pós Graduação em Agronomia e Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná.
- DUGAN, F.M.; HELLIER, B.C; LUPIEN, S.L. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. **Plant Pathology**, v. 52, p. 426, 2003.
- ELLIOT, M.L. et al. *Fusarium oxysporum* f.sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. **Plant disease**, v. 94, n.1, p. 31-38, 2010.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Cultivo de pupunha redesenha a agricultura no litoral do Paraná. Notícias, 14 de março de 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/->

[/noticia/20828921/cultivo-de-pupunha-redesenha-a-agricultura-do-litoral-do-parana>](#)
acessado em 19 de novembro de 2017.

GODSWILL, N.N. et al. Isolation and *in vitro* characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaedis*, causal agent of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) vascular wilt. **Research in Plant Sciences**, v.3, n.1, p.18-26, 2015.

HO, Y.W.; VARGUESE, G.; TAYLOR, G.S. *Fusarium oxysporum* var. *redolens* from Africa as a cause of vascular wilt disease of oil palm. **Phytopathology**, v. 113, p. 373-376, 1985.

KLOKOCAR-SMIT, Z.D. et al. Fusarium rot of onion and possible use of bioproduct. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences**, n. 114, p. 135-148, 2008.

LESLIE, J; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory Manual**. USA: Iowa, 2006.

PARK, B; et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and Knowledge sharing. **Nuclei Acids Research**, vol 39. 2011.

PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.

PLYLER, T.R. et al. Genetic diversity among isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis*. **Plant Pathology**, v. 49, p. 155-164, 2000.

PIZZINATO, M.A et al. Patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* á plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, suplem., p 272, 1998.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**. 90:434-458. 1998

RAVI SANKAR, N.; NAGALAKSHMI DEVAMMA, M.; BAGYANARAYANA, G. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of onions bulbs (*Allium cepa* L.) in India. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v.3, n.2, p. 1-3, 2014.

DOS SANTOS, A.F. et al. Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2008.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

5 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M.Y. et al. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from Date Palm in Saudi Arabia. **Plant Disease**, v.84, n.3, p.321-324, 2000.
- ALMEIDA, C.V. de et al. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.40, n.5, p.467-470, 2005.
- ALVES, S.A.R. et al. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a Podridão do Estipe da Pupunheira no Paraná. **Boletim Pesquisa Florestal**, v.52, p.133-140, 2006.
- BARBOSA, R.N.T. et al. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* no tomateiro. **Revista Agroambiente**, v. 4, n.1, p. x-y, 2010.
- BELLETTINI, S. **Epidemiologia e manejo da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) da pupunheira**. 2010, 85 f. Tese - Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá
- BHALE, U.N., CHATAGE, V.S., AMBUSE, M.G. First report of *Fusarium proliferatum* inciting wilt of *Rumex acetosa* L. in Maharashtra, India. **Plant Pathology and Microbiology**, v. 3, n.1, 2012.
- BRADER, G. et al. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annual Review Phytopathology**, 55, p.61-83, 2017.
- BRODY, J.R & KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.
- BURKE, D.W; MILLER, D.E; BARKER, A.W. Effects of soil temperature on growth of beans in relation to soil compaction and *Fusarium* Root Rot. **Phytopathology**, v.70, p.1047-1049. 1980.
- CICHY, K.A; SNAPP, S,S; KIRK, W.W. *Fusarium* root rot incidence and root system architecture in grafted commom bean lines. **Plant Soil**, v.300, p.233-244. 2007.
- CHONG, S.K et al. Mapping soybean sudden death syndrome as related to yield and soil/site properties. **Soil & Tillage Research**, v.84, p.101-107. 2005.
- COSTA JÚNIOR, J.C. da et al. Qualidade Sanitária e Fisiológica, métodos de detecção de *Fusarium* spp. E tratamento de sementes de pupunheira. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1119-1131. 2016.
- COSTA JÚNIOR, J.C. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pupunheira submetidas a tratamento químico e caracterização dos sintomas da podridão da base do estipe causada por *Fusarium* spp.** 2013. Curitiba: UFPR. 127p (Dissertação Mestrado).
- COSTA, R.V. et al. Metodologia para avaliação da reação de genótipos de milho à *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação. **Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo**, v.179, p.1-7, 2012.

DELAYE, L; GARCIA-GUZMÁN, G; HEIL, M. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens – are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal diversity**, 60, p.125-135, 2013.

DEMERS, J.E; GUGINO, B.K; JÍMENEZ-GASCO, M.D.M. Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field grown tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n.1, p. 81-90, 2015.

DIHAZI, A. et al. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. **Plant Physiol. Biochem**, v.55, p.7-15, 2012.

Do CARMO, A.L.M. ***Fusarium* em sementes de pinus no Brasil: Distribuição, Patogenicidade, Identificação de espécies e controle biológico**. 2017. 87 flh. Tese-Pós Graduação em Agronomia e Produção Vegetal. Universidade Federal do Paraná.

DOS SANTOS, A.F. et al. Palmeiras para a Produção de Palmito: Juçara, Pupunheira e Palmeira Real. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2008.

DUGAN, F.M.; HELIER, B.C; LUPIEN, S.L. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. **Plant Pathology**, v. 52, p. 426, 2003.

ELLIOT, M.L. et al. *Fusarium oxysporum* f.sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. **Plant disease**, v. 94, n.1, p. 31-38, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cultivo de pupunha redesenha a agricultura no litoral do Paraná. Notícias, 14 de março de 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/20828921/cultivo-de-pupunha-redesenha-a-agricultura-do-litoral-do-parana>> acessado em 19 de novembro de 2017.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997.

FOLONI, J.S.S; CALONEGO, J.C; LIMA, S.L. de. Efeito da compactação do solo no desenvolvimento aéreo e radicular de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.947-953, 2003

FRÖHLICH, J; HYDE, K.D; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, 104 (10), p. 1202-1212. 2000.

GANJI, S; WUBBEN, M.J; JENKINS, J.N. Two simple methods for the collection of individual life stages of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology**, v.45, n.2, p.87-91. 2013.

GEISER, D.M. et al. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology** v. 103, p.400-408, 2013.

GLENN, A.E. et al. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **MPMI**, v.21, n.1, p.87-97, 2008.

GODSWILL, N.N. et al. Isolation and *in vitro* characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*, causal agent of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) vascular wilt. **Research in Plant Sciences**, v.3, n.1, p.18-26, 2015.

GOSSEN, B.D et al. Effect of soil type, organic matter content, bulk density and saturation on clubroot severity and biofungicide efficacy. **Plant Pathology**, v.65, p. 1238-1245. 2016.

HASSNI, M. et al. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, n.2, p.224-234. 2007.

HODEL, D.R. 2009. Palm diseases in the landscape: Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. Davis: **Pest notes**, publication 74148: 1-6.

HO, Y.W.; VARGUESE, G.; TAYLOR, G.S. *Fusarium oxysporum* var. *redolens* from Africa as a cause of vascular wilt disease of oil palm. **Phytopathology**, v. 113, p. 373-376, 1985.

KLINGELFUSS, L.H. et al. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira** v.32, n.1, p.50-55, 2007.

KLOKOCAR-SMIT, Z.D. et al. Fusarium rot of onion and possible use of bioproduct. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences**, n. 114, p. 135-148, 2008.

KRAFT, J.M; BOGE, W. Root characteristics in Pea in Relation to compaction and *Fusarium* Root Rot. **Plant Disease**, vol. 85, n.9, p.936-940. 2001.

KUHNEM JÚNIOR PR et al.. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural** 43, n.4. p.583-588, 2013.

KUMAR, S; KAUSHIK, N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. **Plos One**, v. 8, n.2, 2013.

LESLIE, J; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory Manual**. USA: Iowa, 2006.

PARK, B; et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and Knowledge sharing. **Nuclei Acids Research**, vol 39. 2011.

PENTEADO JÚNIOR, J.F. et al. Aspectos do agronegócio do palmito de pupunha no Brasil. **Documentos – Embrapa Florestas**, v.275, p.1-21, 2014.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial Ecology of Leaves** (eds. J.H.Andrews and S.S. Hirano). Springe-Verlag, New York, USA: p.179-197 1991

PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal diversity**, v. 16, p. 131-140, 2004. Available from: < <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/16-4.pdf> > Acessed: Mar. 15, 2017.

PIZZINATO, M.A et al. Patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* à plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, suplem., p 272, 1998.

PIZZINATTO, M.A. et al. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica** v.27, p.263-266, 2001.

PLOCH, S; THINES, M. Obligate biotrophic pathogens of the genus *Albugo* are widespread as asymptomatic endophytes in natural populations of Brassicaceae. **Molecular Ecology**, v. 20, p.3692-3699, 2011.

PLYLER, T.R. et al. Genetic diversity among isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis*. **Plant Pathology**, v. 49, p. 155-164, 2000.

MEDEIROS, R.D. de; SOARES, A.A; GUIMARÃES, R.M. Efeitos da compactação do solo e do manejo da água sobre os componentes de produção e a produtividade de grãos de arroz. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, n.5, p.960-967. 2005.

MOSSANEK, E.A.O. **Indução de perfilhamento em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson)**, 2013. Curitiba: UFPR. 55p. (Dissertação de Mestrado).

NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**. 90:434-458. 1998

RAVI SANKAR, N.; NAGALAKSHMI DEVAMMA, M.; BAGYANARAYANA, G. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of onions bulbs (*Allium cepa* L.) in India. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v.3, n.2, p. 1-3, 2014.

RIASCOS-ORTIZ, D; et al. Reconocimiento de hongos com potencial benéfico associados a la rizosfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K) em la region Pacífico del Valle de Cauca, Colombia. **Acta agronômica**, 60 (4), p.319-327. 2011.

RODRIGUES, K.F; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi a tropical palm. **Mycological research**, v. 94 (6), p.827-830. 1990.

RODRIGUES, P.N.F et al. Crescimento e composição mineral do milho em função da compactação do solo e da aplicação de composto orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.1, p.94-99, 2008.

SANTOS, A.F.; MACIEL, C.M.G.; FOWLER, J.A.P. Detecção de fitopatógenos em sementes de pupunheira e transmissão de *Fusarium* sp. para plântulas. **Comunicado técnico 277, Colombo, Embrapa Florestas, 2011.**

SILVA, R.H. da; ROSOLEM, C.A. Crescimento radicular da soja em razão da sucessão de cultivos e da compactação do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.855-860, 2002.

SOUZA, M.A.S et al. Acúmulo de macronutrientes na soja influenciado pelo cultivo prévio do capim-marandu, correção e compactação do solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.611-622. 2012.

SOUZA, C.D. de. **Caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados à podridão da base do estipe da pupunheira**. 2014. 45f. Dissertação-Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá.

VERHOEFF, J. Latent infections by fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 12, p.99-110. 1974.

VIEIRA, W.A.S; MICHEREFF, S.J; MORAIS JÚNIOR, M.A; HYDE, K.D; CÂMARA, M.P.S. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal diversity**, v. 67, p. 181-202, 2014.

WILKE, A.L. et al. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v.91, p.1109-1115, 2007. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-9-1109>>. Acesso em: 17 set. 2017. doi: 10.1094/PDIS-91-9-1109